



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EFFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
NEUROMELANINA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A O₃**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

EVER DANIEL FERREIRA GARCIDUEÑAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GINA LORENA QUIRARTE

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS JURQUILLA, UNAM

DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 22 de abril de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **FERREIRA GARCIDUEÑAS EVER DANIEL** con número de cuenta **301048048** con la tesis titulada **"EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE NEUROMELANINA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A O₃"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA:**

Presidente: DRA. GINA LORENA QUIRARTE
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Suplente: DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA
Suplente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de mayo de 2013

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, es decir, a todas las personas que con su esfuerzo y compromiso cotidiano, lo construyen y configuran como un posgrado que forma científicos de muy alto nivel académico y ético, comprometidos con el desarrollo de la ciencia y tecnología al servicio de la humanidad.

Al apoyo otorgado por CONACYT en la beca de manutención, siendo el becario 255122. Este apoyo dio el soporte, que permitió mi dedicación de tiempo completo a la formación académica, durante el tiempo establecido por los lineamientos del posgrado.

Los experimentos de esta tesis fueron parcialmente apoyados por DGAPA IN219511 para S. R-A

A mi tutora principal, la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia por su tiempo invertido para mi formación como científico, por su apoyo constante en el desarrollo de este trabajo y por las enseñanzas que compartió conmigo las cuales favorecieron mi crecimiento personal.

In Memoriam al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, que por enfermedad abandonó de improviso la forma humana el 31 de julio de 2012. Dirigió e inspiró parte de este trabajo mismo que realicé con el cuidado científico y la dedicación que me enseñó.

Al Comité Tutor, la Dra. Gina Lorena Quirarte y la Dra. Yolanda López Vidal, que acompañaron y dirigieron mi formación académica, de forma comprometida en cada uno de los momentos en que les presenté avances y que dieron seguimiento hasta la consumación de éste trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi madre Luz María

Porque de forma ejemplar, siempre me dio a manos llenas y me enseñó a usar el azadón y la pala, para que me formara autosuficiente en la sociedad y cumpliera mis sueños de ser investigador y servir a la humanidad. Un servicio que ella me mostró, como el propósito más elevado para un ser humano, en el recuadro del método más elevado, el amor.

A mi padre Jesús y mi abuela Juana

Porque aunque abandonaron la forma humana muy pronto, y regresaron al ciclo de la vida en el universo, su energía y recuerdos formaron y formarán parte de cada momento de ésta mi experiencia humana.

A todos mis familiares, pero en particular mis tías Ana, Marina, Teresa, Concha y mi tío Salvador

Porque apoyaron incondicionalmente, cada vicisitud que encontrábamos mi madre y yo, porque nos protegieron o nos acompañaron, porque con una mirada nos hicieron parte de sus vidas, y porque con una sonrisa entraron en las nuestras, para quedarse.

A mis amigos

Porque con todos ellos aprendí a observar el camino en lugar del destino, porque pulieron mis errores, me explicaron con su cariño que los apellidos solo hacen grupos de parientes, pero que la lealtad nos hace familia, porque juntos despertamos la conciencia social y aprendimos que la oscuridad no debe ser combatida, sino que debe ser iluminada y que para eso estamos aquí.

Al Dr. Kawakami, a su esposa e hijas Ayumi, Midori y Yoshie, por las atenciones que tuvieron conmigo al dar tratamiento a las complicaciones óseas faciales que se generaron en mi cuerpo cuando dejó de responder por un grave accidente.

A Lorena Alline Becerril Meléndez que me apoyó y acompañó de cerca en la realización de una parte de los experimentos de este trabajo.

ÍNDICE

JURADO	III
AGRADECIMIENTOS	IV
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL	V
ÍNDICE	VI
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.2. NEUROANATOMÍA	12
1.2.1. Circuito Motor	12
1.3. ENFERMEDAD DE PARKINSON	14
1.4. RADICALES LIBRES	18
1.5. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	19
1.5.2. El Ozono	20
1.5.3. El Oxígeno Singulete	20
1.5.4. Anión Superóxido	21
1.5.5. Peróxido de Hidrógeno y Radical Hidroxilo	21
1.6. EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	23
1.6.1. El Sistema Glutación	23
1.6.2. El Grupo Tiol	25
1.6.3. La Conformación Estructural Generada Por El Grupo Tiol	26
1.6.4. El Grupo Tiol y los Sistemas de NADP+/Tiorredoxina Y Glutarredoxina	26
1.6.5. El Factor Nrf2	27
1.7. TIPOS DE MELANINAS, FORMACIÓN Y COMPOSICIÓN	29
1.7.1. Formación de Melanina	30
1.7.2. Metabolitos Relacionados con la Melanina	32
1.8. NEUROMELANINA	32
1.8.1. Biosíntesis de Neuromelanina	34
1.9. LA EXPOSICIÓN A OZONO COMO MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO	35
1.9.1. Efectos de la Exposición a Ozono	36
1.9.2. Oxidación Lipídica y Proteica por Efecto de la Exposición a Ozono	37
1.9.3. Toxicidad de la Exposición a Ozono	38
2. OBJETIVO GENERAL	39
2.1. OBJETIVOS PARTICULARES	39
3. ANTECEDENTES	40
3.1. HIPÓTESIS	40
4. METODOLOGÍA GENERAL	41
4.1. EXPOSICIÓN A OZONO	41
LISTA DE ABREVIATURAS	43

4.2. GLUTATIÓN TOTAL, GLUTATIÓN REDUCIDO Y GLUTATIÓN OXIDADO	44
4.2.1. Glutación total	44
4.2.2. Glutación oxidado	45
4.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA	46
4.4. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA	47
4.5. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	48
4.6. TINCIÓN DE NEUROMELANINA	49
4.7. ESTADÍSTICA	49
5. RESULTADOS	50
5.1. CANTIDAD DE GLUTATIÓN TOTAL EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	50
5.1.2. Cantidad de glutación reducido en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono	51
5.1.3. Cantidad de glutación oxidado en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono	52
5.1.4. Comparación entre las concentraciones de glutación reducido y glutación oxidado (Índice GSSG/GSH) en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono	53
5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA LA ENZIMA Γ-GLUTAMILCISTEINIL SINTETASA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	54
5.3.1. Número de células inmunoreactivas a la enzima γ -glutamylcisteinil sintetasa	55
5.3.2. Densidad de pixeles positivos a la inmunoreactividad de la enzima γ -glutamylcisteinil sintetasa	56
5.4. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA EL NRF2 EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	57
5.4.1. Número de células con núcleos positivos a la inmunoreactividad del factor de transcripción Nrf2	58
5.4.2. Densidad de pixeles positivos a la inmunoreactividad del factor de transcripción Nrf2	59
5.5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	60
5.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN REDUCTASA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	61
5.7. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA 3 NITROTIROSINA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	62
5.7.1. Número de células inmunoreactivas a 3-NT	63
5.7.2. Densidad de pixeles positivos a la inmunoreactividad a la 3-NT	64
5.8. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA LA ENZIMA PROTEÍNA 2 RELACIONADA CON LA TIROSINASA O DOPACROMO TAUTOMERASA (TRP-2) EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	65
5.8.1. Número de células positivas a la inmunoreactividad de la enzima Trp-2	66
5.8.2. Densidad de pixeles positivos a la inmunoreactividad de la enzima Trp-2	67
5.9. HISTOQUÍMICA PARA LA TINCIÓN DE NEUROMELANINA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO	68
5.9.1. Número de células positivas a la tinción argéntica para neuromelanina	69
5.9.2. Densidad de pixeles positivos de la tinción de la técnica argéntica para neuromelanina	70
6. DISCUSIÓN	71
6.1. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE. SÍNTESIS DE GLUTATIÓN, SISTEMA GLUTATIÓN Y NRF2	71
6.2. SÍNTESIS DE NEUROMELANINA	73
7. CONCLUSIONES	76
8. APÉNDICE	77
9. BIBLIOGRAFÍA	80

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Circuito motor	14
Figura 2. Circuito motor y Enfermedad de Parkinson	17
Figura 3. Reacción de Fenton	22
Figura 4. Síntesis de glutatión en los sistemas neuroglias	24
Figura 5. Sistema Glutatión	25
Figura 6. Criegee ozónido	37
Figura 7. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la concentración del glutatión total en la sustancia nigra de ratas	50
Figura 8. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la concentración del glutatión reducido en la sustancia nigra de ratas	51
Figura 9. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la concentración del glutatión oxidado en la sustancia nigra de ratas	52
Figura 10. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono en la proporción GSSG/GSH	53
Figura 11. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunoreactividad a la enzima γ -glutamylcysteinil sintetasa	54
Figura 12. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas a la γ -glutamylcysteinil sintetasa	55
Figura 13. Densidad de pixeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de γ -glutamylcysteinil sintetasa	56
Figura 14. Inmunohistoquímica contra Nrf2 en sustancia nigra de ratas expuestas a ozono	57
Figura 15. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas al Nrf2	58
Figura 16. Densidad de pixeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de Nrf2.	59
Figura 17. El efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la actividad de la enzima Glutatión peroxidasa	60
Figura 18. El efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la actividad de la enzima Glutatión reductasa	61
Figura 19. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunoreactividad al 3-NT	62
Figura 20. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas a 3-NT	63
Figura 21. Densidad de pixeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de 3-NT	64
Figura 22. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunoreactividad a la Trp-2	65
Figura 23. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas a la enzima Trp-2	66
Figura 24. Densidad de pixeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de Trp-2	67
Figura 25. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la tinción de neuromelanina	68
Figura 26. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células positivas a la tinción de neuromelanina	69
Figura 27. Densidad de pixeles positivos en cinco microfotografías de la tinción de neuromelanina	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Configuración electrónica	19
Tabla 2. Tipos de melaninas	29
Tabla 3. Reactivos utilizados	42
Tabla 4. Procedimiento para medición de glutatión total	44
Tabla 5. Procedimiento para medición de glutatión oxidado	45
Tabla 6. Cálculo para mezcla de reacción en la medición de la actividad de la Gpx	46
Tabla 7. Procedimiento para medición de actividad de la Gpx	47
Tabla 8. Prueba estadística de Levene	77
Tabla 9. Prueba estadística de Kruskal-Wallis	78
Tabla 10. Prueba estadística de U de Mann Whitney	79

RESUMEN

En un equilibrio redox las especies reactivas inducen la expresión de los sistemas antioxidantes endógenos, sin embargo, ante la pérdida de este equilibrio se genera un estado de estrés oxidativo, el cual está presente en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. Por mecanismos que no están completamente esclarecidos, los pacientes con esta enfermedad presentan una disminución en las concentraciones de glutatión y de la formación de neuromelanina en la sustancia nigra. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del estado de estrés oxidativo sobre el sistema glutatión y su relación con la producción de neuromelanina en sustancia nigra de ratas.

Material y métodos: Se utilizaron 78 ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g y se dividieron en 6 grupos al azar (n=13), el grupo 1 fue expuesto a aire ambiental; los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 fueron expuestos durante 7, 15, 30, 60 y 90 días a ozono respectivamente por 4 horas a una dosis de 0.25 ppm. Al término de cada tratamiento y bajo anestesia se obtuvieron los cerebros para técnicas de espectrofotometría, inmunohistoquímica e histoquímica. Por espectrofotometría se cuantificaron las concentraciones de glutatión total, glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (Gr). Se realizó inmunohistoquímica contra la enzima gamma glutamilcisteinil sintetasa (γ -GCS), el Factor Nuclear Eritroide-2 (Nrf2), la 3-nitrotirosina (3-NT) y la enzima Dopacromo Tautomerasa (Trp-2), además se estudió la neuromelanina mediante histoquímica.

Los resultados indican que la exposición a ozono genera alteraciones entre el GSH y el GSSG así como en la actividad de las enzimas GPx y Gr. Estos cambios se acompañan de un incremento de la γ -GCS, del Nrf2, de la 3-NT y de la Trp-2 en relación con el aumento de los días de tratamiento con ozono. Además, la formación de neuromelanina se incrementa desde los 7 días y disminuye significativamente después de los 15 días de exposición a ozono.

De acuerdo a los resultados obtenidos el estrés oxidativo causado en ratas por la exposición a bajas dosis de ozono, produce alteraciones entre la forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) del glutatión, ya que el establecimiento de un estado de estrés oxidativo también generó modificaciones en la actividad de las enzimas Gr y GPx. El aumento de la expresión de la enzima γ -GCS no es capaz de incrementar las concentraciones de glutatión total y el aumento de la inmunoreactividad a la 3-NT y a la Trp-2 se relaciona con el aumento de los días de exposición a ozono. Los resultados de este trabajo, indican que la exposición a ozono genera pérdida de la regulación en el sistema glutatión que se acompaña de un déficit en la formación de neuromelanina y cambios neurodegenerativos en la sustancia nigra de rata.

ABSTRACT

In a redox equilibrium, the reactive species can induce expression of endogenous antioxidant systems; however, the loss of this balance generates a state of oxidative stress, which is present in neurodegenerative diseases like Parkinson Disease. By mechanisms that are not fully understood, those patients with this disease, have a decreased in the glutathione concentrations and in their formation of neuromelanin in the substantia nigra. The aim of this work was to study the effect of oxidative stress status on the glutathione system and its relationship with the production of neuromelanin in substantia nigra of rats.

Materials and methods: We used 78 male rats of the Wistar strain of 250-300 g and were divided randomly into 6 groups (n = 13), group 1 was exposed to ambient air; the groups 2, 3, 4, 5 and 6 were exposed for 7, 15, 30, 60 and 90 days respectively to ozone for 4 hours at a dose of 0.25 ppm. At the end of each treatment and under anesthesia, the brains were obtained for test the spectrophotometric, immunohistochemistry and histochemistry techniques. By spectrophotometry, total glutathione concentrations, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and the activity of the enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were quantified. Immunohistochemistry was performed against the enzyme gamma glutamylcysteinyl synthetase (γ -GCS), the erythroid Nuclear Factor-2 (Nrf2), 3-nitrotyrosine (3-NT) and the enzyme Dopachrome tautomerase (Trp-2). The neuromelanin was also studied by histochemistry.

The results indicate that exposure to ozone generates alterations between GSH and GSSG as well as the enzymatic activity of GPx and Gr. These changes are accompanied by an increase in the γ -GCS, Nrf2, of 3-NT and the Trp-2 in relation to the increase in days of treatment with ozone. Furthermore, the formation of neuromelanin increases since the 7 days and significantly decreases after 15 days of exposure to ozone.

According to these results, oxidative stress in rats caused by exposure to low doses of ozone, leads to changes between the reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione because the establishment of a state of oxidative stress also generated changes in the activity of enzymes GPx and Gr. Increased expression of the enzyme γ -GCS is not capable of increasing total glutathione concentrations and the increased immunoreactivity to 3-NT and Trp-2 is related to the increase in days of exposure to ozone. The results of this work indicate that exposure to ozone generates the loss of regulation in the system glutathione, accompanied by a deficiency in the formation of neuromelanin and neurodegenerative changes in the substantia nigra of the rat.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es una condición propia del metabolismo celular, donde la producción de especies oxidantes es necesaria para el correcto funcionamiento de los sistemas vivos, sin embargo cuando existe un desequilibrio entre estas especies y las especies antioxidantes, gradualmente llevará al establecimiento de un estado de estrés oxidativo que llevará consigo el desarrollo de un proceso neurodegenerativo. Con esto es posible sugerir que existe un factor en común en el inicio de la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. En particular, aunque se considera de etiología multifactorial, el estudio de los cambios que ocurren en la Enfermedad de Parkinson, ha hecho posible conocer que la neurodegeneración se debe a mecanismos moleculares que están relacionados entre sí como son: las modificaciones causadas por la oxidación, la disfunción mitocondrial y las alteraciones de la α -sinucleína (Uversky et al., 2005).

Una causa molecular que puede provocar alteración de las proteínas, así como la degeneración neuronal, es la presencia exacerbada de especies reactivas de oxígeno y la incapacidad de los sistemas antioxidantes para contrarrestarlas. En estudios postmortem del tejido cerebral de sujetos que padecieron la Enfermedad de Parkinson, se ha encontrado un aumento significativo de las formas oxidadas de biomoléculas estructurales y funcionales (proteínas, lípidos, ADN, etc.) y cambios diversos en las formas nativas de diversas proteínas en comparación con el tejido cerebral de sujetos que no padecieron esta enfermedad (Jenner y Olanow, 1996; Dumitriu et al., 2012).

La reducción electrónica del oxígeno para dar lugar a la formación de la molécula de agua, es un proceso metabólico fundamental para la sobrevivencia de los organismos en ambientes aeróbicos. En el metabolismo ocurren reacciones de oxidación y reducción que hacen posibles múltiples procesos como el de la síntesis de las catecolaminas, la producción de moléculas de señalización como el óxido nítrico y el metabolismo de los xenobióticos en el sistema nervioso. Los sistemas enzimáticos acoplados a las reacciones de oxidación y reducción permiten el paso de los electrones a los sustratos, lo cual asegura la reducción de los cuatro electrones del oxígeno, sin embargo, inevitablemente tiene lugar una reducción incompleta del oxígeno en un porcentaje menor lo cual da origen a especies reactivas, como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esto puede ocurrir en el ambiente celular en general aunque con mucha mayor probabilidad en el ambiente mitocondrial, debido a que se trata de un organelo con gran cantidad de reacciones de oxidación y reducción como la cadena de transporte de electrones (Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H, 2009).

Por otro lado, la generación de especies reactivas resulta ser una señal de inducción para la formación de defensas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD) (de la cual, existen dos tipos en nuestras células, la SOD Cu-Zn en el citoplasma, y la SOD Mn en la mitocondria), la catalasa, la glutatión S-transferasa y el sistema glutatión, que en su conjunto reducen al oxígeno para formar moléculas de agua a partir de las especies reactivas (Malkus et al., 2009).

A pesar de estos mecanismos de regulación, las especies reactivas pueden causar daño oxidante cuando existe un incremento en sus concentraciones y éste

ocurre simultáneamente con una insuficiencia de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos. Aunque se genere un daño estructural por las modificaciones oxidativas, la célula tiene mecanismos de degradación de proteínas alteradas, recambio de lípidos de membrana y enzimas de reparación que regresan a la célula al estado de homeostasis previo. Sin embargo, las alteraciones directas a estos mecanismos de reparación, ya sea mediante una modificación oxidante directa o indirectamente por la incapacidad de procesar sustratos modificados por la oxidación, pueden hacer que la célula ya no sea capaz de eliminar eficazmente las biomoléculas oxidadas, dando lugar a la acumulación de éstas y a una mayor formación de especies reactivas; en conjunto es así como se establece un estado de estrés oxidativo.

Las alteraciones en el procesamiento de las proteínas y su oxidación, la oxidación de lípidos, la disfunción mitocondrial y el establecimiento de un estado de estrés oxidativo son factores que están asociados con la génesis y evolución de las enfermedades neurodegenerativas (Malkus et al., 2009, Rivas-Arancibia et al., 2010).

1.2. NEUROANATOMÍA

La sustancia nigra es una de las regiones claves que degeneran en la Enfermedad de Parkinson y está involucrada en procesos tanto de memoria y aprendizaje como de la regulación motora.

Las estructuras involucradas son los núcleos de la región ventral del diencefalo, conocidos como ganglios basales y son el núcleo caudado y el putamen (cuerpo estriado en la rata), el globo pálido externo e interno y el núcleo subtalámico. También resulta de gran importancia una región del mesencefalo, la sustancia nigra que consta de dos partes, la pars compacta y la pars reticular. Desde 1986, se estudió la forma en como se establecen las conexiones de los ganglios basales entre si y con la corteza cerebral (Alexander et al., 1986). Se identificó entonces el circuito motor, el circuito oculomotor, el circuito asociativo y el circuito límbico. Estos circuitos dependen de sitios específicos de los ganglios basales y para fines de este trabajo es de particular importancia el circuito motor.

1.2.1. CIRCUITO MOTOR

Actualmente se conoce que el circuito motor está conformado por estructuras que permiten la transmisión de información de la corteza motora a los ganglios basales. La vía de entrada de información del circuito motor son las aferencias de neurotransmisión glutamatérgica cortical y va dirigida a los núcleos caudado y putamen. Éstas además son moduladas por proyecciones de neurotransmisión dopaminérgica. Así mismo se conocen las vías de salida que son a través del globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticular que proyectan hacia el tálamo, ascienden y se continúan hasta la corteza cerebral para así, ejecutar una retroalimentación del circuito motor.

La organización del circuito motor permite la integración de áreas motoras precentrales y áreas sensitivas poscentrales con la región sensitivomotora del putamen dorsolateral. Para estas vías en particular la neurotransmisión involucrada es la glutamatérgica por lo que se trata de una vía excitadora.

El circuito motor consta de una vía directa (1) y una indirecta (2) que parten del putamen cuyo nombre se debe a las sinapsis que una y otra poseen en su trayecto hacia los ganglios basales. La vía directa es monosináptica y se proyecta sobre la región sensitivomotora del globo pálido (3) y la sustancia nigra pars reticular (4). Se origina en neuronas GABAérgicas espinosas medias; estas neuronas expresan receptores dopaminérgicos D1 por lo que cuando la dopamina tenga efecto en ellas se activarán y ejercerán su acción GABAérgica, es decir, una acción inhibitoria.

La vía indirecta está constituida por múltiples sinápsis donde son expresados receptores dopaminérgicos D2, que tienen un efecto inhibitorio ante la presencia de dopamina, sobre las neuronas que los expresan. Esta vía se proyecta del putamen al globo pálido externo mediante vías GABAérgicas (5) y a la región sensitivomotora de núcleo subtalámico (6). Este a su vez está conectado mediante vías glutamatérgicas con el globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticular (7). Dicho de otra forma el núcleo subtalámico tienen un efecto excitador en las vías de salida del circuito motor. En estos núcleos de salida existen neuronas que proyectan al tálamo en sus núcleos ventrales anterior y lateral mediante neurotransmisión GABAérgica (8). El tálamo a su vez proyectará hacia la corteza cerebral. La sustancia nigra pars reticular también proyecta al colículo superior y al núcleo pedúnculo pontino. El globo pálido interno proyecta de igual forma hacia este.

Cuando el tálamo proyecta hacia la corteza cerebral, lo hace mediante neuronas de naturaleza glutamatérgica, por lo tanto, éstas tienen un efecto excitador sobre las áreas sensitivomotoras corticales (9). Es en este punto donde el circuito se retroalimenta y se establece el circuito motor.

En resumen, el circuito motor por la vía directa se inicia cuando la información desciende de la corteza al putamen e inhibe mediante neurotransmisión GABAérgica al globo pálido interno (3) y a la sustancia nigra pars reticular (4). Como estos envían señales inhibitorias al tálamo (8), si son inhibidos previamente, el tálamo no tendrá restricción y enviará información mediante neurotransmisión glutamatérgica a la corteza cerebral (9). El efecto final de estos mecanismos altamente regulados es una retroalimentación positiva de los movimientos orquestados por la corteza cerebral. En otras palabras se consolida un circuito que redundará en la facilitación motriz.

Por otro lado ante la presencia de la vía indirecta, la estimulación que inicia en la corteza y que llega al putamen, produce una inhibición del globo pálido externo (5) y como éste envía señales inhibitorias al núcleo subtalámico (6), si es inhibido resultará en una mayor transferencia de información excitadora por parte del núcleo subtalámico al globo pálido interno y a la sustancia nigra pars reticular (7) que a su vez enviarán un mayor gradiente de información al tálamo mediante neurotransmisión GABAérgica (8), es decir tienen un efecto inhibitorio sobre el tálamo. El efecto final es la señal de detención del movimiento en la corteza cerebral. En este contexto la sustancia nigra tiene un papel preponderante en la modulación de la actividad motora siendo el sitio productor de dopamina (10), neurotransmisor necesario para que sea posible dicha modulación.

Lo anterior establece la serie de regulaciones positivas, negativas y el equilibrio entre ambas vías para que exista una contracción y relajación muscular ordenadas para la ejecución de movimientos precisos y controlados (Hikosaka et al., 2000) (Marsden and Obeso, 1994)). Finalmente la voluntad del movimiento esta entonces integrada por la corteza cerebral, sin embargo cualquier alteración en el circuito motor puede causar cambios patológicos en el control del mismo, tal como ocurre en la Enfermedad de Parkinson, que más adelante se abordará.

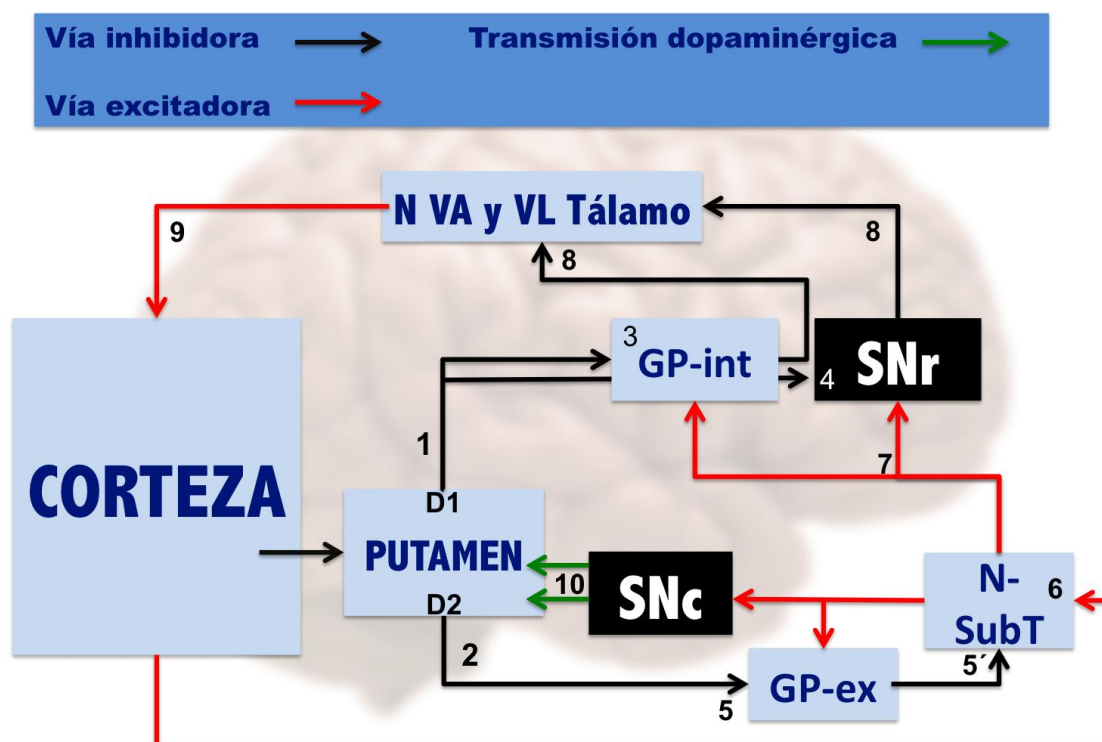


Figura 1. Circuito motor. Se muestran los puntos descritos en el texto numerados según su orden de aparición en el mismo. N VA y VL: núcleo ventral anterior y ventral lateral del tálamo; GP-int: globo pálido interno; GP-ext: globo pálido externo; SNr: sustancia nigra parte reticular; SNc: sustancia nigra parte compacta; D1: receptor a dopamina familia tipo 1 (efecto excitador); D2: receptor a dopamina familia tipo 2 (efecto inhibitor) y N-SubT: núcleo subtalámico.

La sustancia nigra se conoce entonces como una estructura heterogénea, que produce el neurotransmisor que involucrado en el correcto funcionamiento del circuito motor, la dopamina, y que tiene interacción directa con el resto de las estructuras que regulan el movimiento, el control muscular y el equilibrio; el daño lento y progresivo en este complejo representa el inicio de la Enfermedad de Parkinson.

1.3. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La Enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que particularmente afecta a la neurotransmisión dopaminérgica del sistema nigroestriatal. Es una enfermedad progresiva con un largo tiempo de evolución en el cual se observa una alteración del circuito motor que lleva también a la alteración de las funciones cerebrales. Alrededor del 1% de la población mundial es afectada por esta enfermedad a los 60 años (Hindle, 2010).

Estudios recientes indican que existe una relación entre las alteraciones de la proteína α -sinucleína, la formación de cuerpos de Lewy y los fenómenos que están directamente relacionados con la pérdida de las funciones que presentan los pacientes con Enfermedad de Parkinson. Existen estudios con modelos de experimentación que reportan que la muerte neuronal tiene vías necróticas y apoptóticas (Graeber and Moran, 2002)) junto con la presencia de un microambiente inflamatorio (Hirsch et al., 1988); (Tansey and Goldberg, 2010) y que existen factores que preceden a la disfunción y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (Braak et al., 2003)) como los cambios en el equilibrio de redox y en la homeostasis mitocondrial así como una disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes (Bandopadhyay and de Belleruche, 2010).

Los datos obtenidos en los últimos años de investigación ha permitido el diseño de terapias dirigidas contra uno o varios de los mecanismos que eventualmente han de converger en la muerte neuronal (Postuma et al., 2010).

Existen factores que particularmente contribuyen a la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas. Se han identificado que factores como la pérdida de la homeostasis mitocondrial y las alteraciones de la cadena de transporte de electrones, la pérdida de la regulación de las especies reactivas del oxígeno por parte de los sistemas antioxidantes, la disminución de funciones celulares como la autofagia y la degradación de proteínas por parte del proteasoma (por consiguiente la acumulación de proteínas disfuncionales), la activación de vías proapoptóticas y de síntesis de mediadores proinflamatorios, suman en conjunto los factores determinantes que llevan a la neurodegeneración selectiva de este grupo neuronal (Cavalli et al., 2008). De forma que las alteraciones en la homeostasis mitocondrial llevan directamente a la pérdida de la producción energética. Se ha demostrado que el bloqueo del Complejo I de la cadena de transporte de electrones en modelos animales, reproduce las alteraciones bioquímicas y celulares de la Enfermedad de Parkinson (Vives-Bauza et al., 2009) además de un aumento de las especies reactivas del oxígeno que llevan a la pérdida de la función mitocondrial (Bisaglia et al., 2010)).

El impacto de las especies reactivas también ocurre en otros organelos como el proteasoma. El tratamiento con quelantes de metales (como quelantes del hierro que participa de reacciones químicas como la reacción de Fenton en donde se producen especies reactivas) ha dado como resultado un mantenimiento de la actividad del proteasoma (Zhu et al., 2010).

Por otra parte, la acumulación de proteínas disfuncionales en el sitio intracelular de las neuronas dopaminérgicas puede ocurrir principalmente por la alteración de los procesos de autofagia y de la alteración de la función del proteasoma. La autofagia es necesaria para que proteínas intracelulares defectuosas sean recicladas en los lisosomas. Estos procesos están altamente regulados por activación génica (Koga et al., 2011). Con la edad, los mecanismos de regulación se alteran causando la acumulación de formas mutadas de proteínas que llevarán al desarrollo de los cambios celulares que subyacen a la enfermedad de Parkinson (Cuervo et al., 2010). La degradación proteica por la vía del sistema ubiquitina-proteasoma es otro mecanismo por el cual ocurre la remoción de las proteínas alteradas en el citoplasma (Betarbet et al., 2005) por lo que una disminución en esta actividad contribuye a la disfunción de los procesos

de autofagia y se adiciona a las consecuencias de la misma (Snyder and Wolozin, 2004).

Por otro lado, a pesar de que la apoptosis es un mecanismo de homeostasis de diversos grupos celulares, está presente en el proceso neurodegenerativo. Una familia de proteínas está involucrada directamente en este proceso y es la familia de las caspasas. La pérdida de la homeostasis mitocondrial lleva al aumento de la permeabilidad de su membrana y a la liberación del citocromo C lo que a su vez activará la vía de las caspasas y con ello desencadenará el proceso apoptótico de la célula en cuestión (de Castro et al., 2010, Zhivotovsky and Orrenius, 2010).

Además la presencia de moléculas proinflamatorias ha sido demostrada en el contexto del proceso neurodegenerativo que tiene lugar en la Enfermedad de Parkinson. Múltiples trabajos demuestran la activación de células como la microglía en el putamen, núcleo caudado y en la sustancia nigra pars compacta en muestras de pacientes que padecieron la enfermedad así como en los modelos animales de la Enfermedad de Parkinson (Barcia et al., 2004, Tansey and Goldberg, 2010) Algunas de las moléculas reconocidas como involucradas en el proceso inflamatorio presente en esta patología son el Factor de Necrosis Tumoral- α y el Interferón- γ (Jiang et al., 1998, Hirsch and Hunot, 2009).

Los trastornos motores característicos de la Enfermedad de Parkinson hacen referencia a cambios funcionales directamente del circuito motor y se deben a la depleción dopaminérgica de la vía nigroestriada y alteraciones en la densidad de receptores D1 y D2. Durante la Enfermedad de Parkinson ocurre una pérdida del control en el putamen y caudado porque hay una pérdida de las neuronas que proyectan a este núcleo desde la pars compacta de la sustancia nigra (1). Al ocurrir esto, las neuronas GABAérgicas de la vía indirecta no serán inhibidas, aunque expresen receptores D2, pues la transmisión dopaminérgica está disminuida y por consiguiente aumenta la actividad GABAérgica sobre el globo pálido externo (2), siendo el resultado la inhibición de la actividad de éste. Así mismo disminuye la inhibición sobre el núcleo subtalámico (3) (que depende del globo pálido externo) y aumenta su transmisión, que es excitadora (4), hacia el globo pálido interno y sustancia nigra pars reticular (4). Si estos últimos son la vía de salida del circuito motor y son inhibidores, al estar sobreestimulados por la excitación proveniente del núcleo subtalámico (4), entonces inhibirán directamente al tálamo (5) y éste disminuirá la señal de “movimiento” a la corteza cerebral (6). En cuanto a la vía directa, en el putamen las neuronas que inician la vía directa son GABAérgicas y poseen receptores D1, sin embargo ante la falta de dopamina proveniente de la sustancia nigra pars compacta, no son estimuladas y su actividad inhibitoria sobre globo pálido interno está disminuida (7), en otras palabras, los receptores D1 no pueden estimular a estas neuronas GABAérgicas y no podrán a su vez inhibir al globo pálido interno, de ésta forma quedará sobreactivado, es decir aumenta su función inhibitoria hacia el tálamo (5), lo cual redundará con la disfunción de la vía indirecta. Lo anterior se resume en que la disfunción dopaminérgica de la sustancia nigra pars compacta, genera más adelante, la sobreexcitación del globo pálido interno (4) y la sustancia nigra pars reticular (4) que inhiben la actividad talámica (5) y por tanto, la señal de “movimiento” hacia la corteza, se encuentra también depletada (6). Esto explica la bradicinesia e hipocinesia de la Enfermedad de Parkinson.

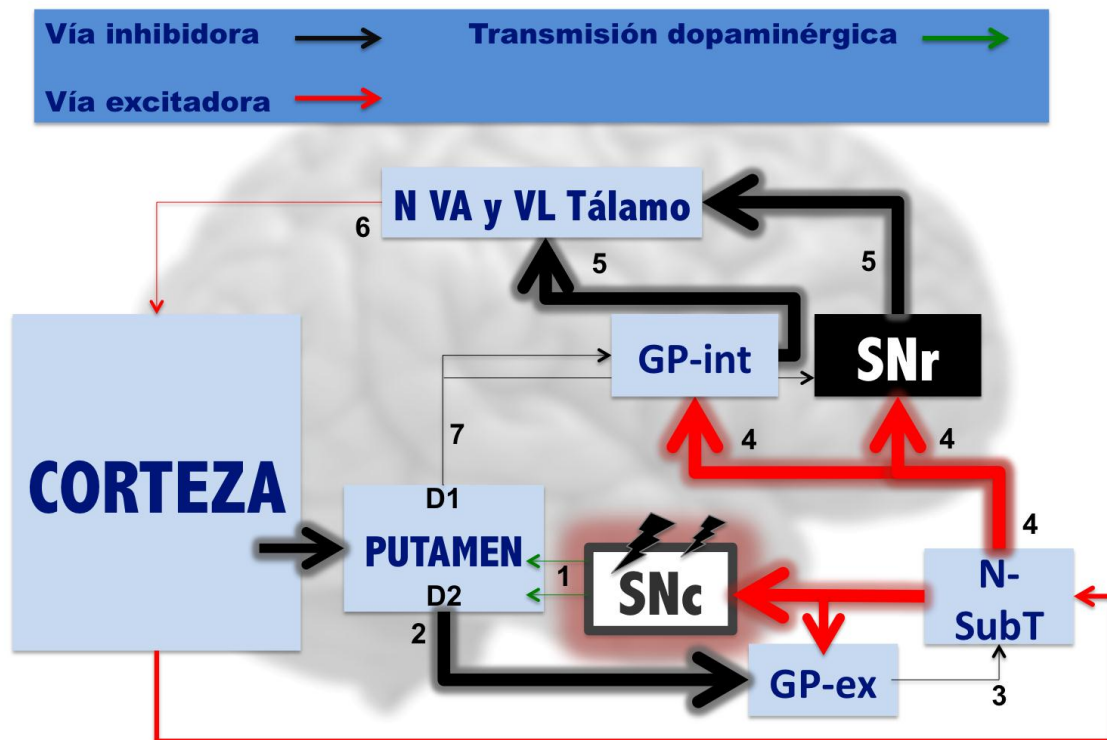


Figura 2. Circuito motor y Enfermedad de Parkinson Se muestra el circuito motor y los puntos descritos en el texto numerados según su orden de aparición en el mismo. N VA y VL: núcleo ventral anterior y ventral lateral del tálamo; GP-int: globo pálido interno; GP-ext: globo pálido externo; SNr: sustancia nigra parte reticular; SNc: sustancia nigra parte compacta; D1: receptor a dopamina familia tipo 1 (efecto excitador); D2: receptor a dopamina familia tipo 2 (efecto inhibitorio) y N-SubT: núcleo subtalámico.

Además, está reportado que el número de neuronas dopaminérgicas que producen neuromelanina, normalmente disminuye con el envejecimiento (Fearnley and Lees, 1991) por lo que normalmente el pigmento lo hace también, sin embargo en la Enfermedad de Parkinson existe una disminución de hasta un 50% de la cantidad de neuromelanina en comparación con controles de la misma edad (Zecca et al., 2002) esto se explica porque hay menos células que formen neuromelanina y porque las neuronas sobrevivientes en estos pacientes presentan un decremento de las concentraciones de neuromelanina (Langston et al., 1999).

Se ha mencionado que la inflamación está involucrada en el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson. En numerosos estudios de modelos animales de Enfermedad de Parkinson se ha observado la presencia de gránulos de neuromelanina en el sitio extracelular (McGeer et al., 1988, Langston et al., 1999). Esta es una de las formas de como la microglía es activada de forma crónica, perpetuando así el ambiente inflamatorio (McGeer et al., 1988).

Es importante mencionar que la neuromelanina reduce la vulnerabilidad de las células que la poseen (Offen et al., 1997) ya que es capaz de quelar metales como el hierro y compuestos tóxicos para las neuronas (Faucheux et al., 2003a). De esta forma, la ausencia del pigmento puede derivar en la presencia de hierro libre, mismo que puede

participar en reacciones de oxidación y reducción en el citoplasma, donde una consecuencia directa es la formación de radicales libres.

1.4. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son especies químicas que son capaces de existir independientemente (por eso llamados libres) y poseen uno o más electrones desapareados (Gutteridge and Halliwell, 1992), exponiendo así su condición magnética (McCord, 2000) lo cual hace que sean muy reactivos y puedan captar electrones de moléculas adyacentes (McCord, 2000). Una vez que un radical libre ha sustraído un electrón, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre al quedar con un electrón desapareado, iniciándose así un daño en cadena entre las biomoléculas. La vida media biológica de un radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar rápidamente con lo que esté a su alrededor provocando oxidación en las moléculas de membranas celulares y tejidos; sin embargo esta capacidad reactiva varía dentro de un gran espectro. Nuestro organismo produce cantidades moderadas para responder a la agresión por patógenos y como parte de múltiples procesos celulares. La producción de radicales libres es continua en las células y estos son contrarrestados por los sistemas antioxidantes. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando resulta insuficiente la actividad de las defensas antioxidantes y los mecanismos de reparación y celular, estableciéndose así un estado de estrés oxidativo con acumulación durante años de biomoléculas en sus formas oxidadas (Finkel and Holbrook, 2000).

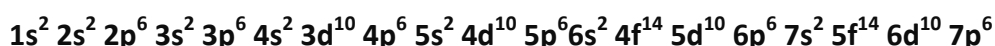
Los radicales libres fueron descritos en sistemas vivos hace ya más de 50 años por Commoner y Townsed. El primer radical libre orgánico identificado fue el radical trifenilmetilo, por Moses Gomberg en la Universidad de Michigan, EUA, hacia 1900. Décadas más tarde, se encontraron numerosas especies de radicales libres y se propuso que los radicales libres provenientes del oxígeno podrían ser formados como productos en el curso de las reacciones enzimáticas del metabolismo celular. En ese momento se hizo una asociación causal entre las especies reactivas de oxígeno y los procesos neurodegenerativos. Fue entonces que la molécula de oxígeno tomó un nuevo significado hacia los años 60's y 70's y los radicales libres empezaron a ser considerados como elementos importantes para los sistemas biológicos. Entre otros hallazgos, se descubrió la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 (McCord and Fridovich, 1969) con este hallazgo se comprobó de forma convincente la importancia de los radicales libres en los sistemas biológicos. Es razonable pensar que debido a que los organismos han estado expuestos a las especies reactivas por al menos dos mil millones de años se han desarrollado mecanismos de defensa para contrarrestar su efecto, ya que tanto los radicales libres como las defensas antioxidantes evolucionaron simultáneamente en los seres vivos.

Es necesario mencionar que el hecho de que una especie química sea un radical libre no indica que sea altamente reactivo. Para comprender como es que los radicales libres adquieren la reactividad conviene recordar la configuración electrónica.

Tabla 1. Configuración electrónica

	s	p	d	f
nivel de energía 1	1s			
nivel de energía 2	2s	2p		
nivel de energía 3	3s	3p	3d	
nivel de energía 4	4s	4p	4d	4f
nivel de energía 5	5s	5p	5d	5f
nivel de energía 6	6s	6p	6d	
nivel de energía 7	7s	7p		

Sabiendo que el llenado orbital con electrones ocurre de uno en uno y en el sentido que en la tabla corresponde de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo en forma diagonal (Principio de Aufbau) la configuración corresponde a la siguiente:



Para el oxígeno atómico, la configuración electrónica es $1s^2 2s^2 2p^4$. Con esto sabemos que el orbital P de cada oxígeno pueden alojar hasta 2 electrones, en total 4 cuando se trata de una molécula diatómica (O_2). Como sabemos, el orbital P consta de tres orbitales que pueden alojar hasta 2 electrones cada uno. En el caso de un átomo de oxígeno, un orbital P se encuentra lleno y los otros dos orbitales poseen un electrón cada uno, quedando desapareados. Esta condición le da al oxígeno la característica de radical libre y para que una molécula de O_2 pueda tener una reducción completa requerirá de 4 electrones en total. De lo contrario quedarán formados metabolitos inestables por tener una reducción incompleta, como el H_2O_2 que no es propiamente un radical libre sino una especie química capaz de formarlos, es decir, es una especie reactiva del oxígeno.

1.5. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

El oxígeno has sido considerado como un gas elemental para la vida aeróbica, sin embargo, aun para estos organismos, puede resultar tóxico e incluso letal. Este gas representa el 21% de la composición de la atmosfera de este planeta y está formado en su mayor parte por la oxidación del agua. Los organismos que realizan fotosíntesis son los encargados de este proceso químico y los organismos aerobios poseemos un metabolismo que lo integra en reacciones químicas para la obtención de energía en la cuales se realiza una reducción mediante trasferencia electrónica que generará especies químicas parcialmente reducidas hasta llegar a agua (Aguirre et al, 2005).

La reactividad del oxígeno es relativamente baja pues no reacciona fácilmente en condiciones atmosféricas o lo hace de forma muy lenta, pero no así en presencia de temperaturas elevadas. Sin embargo, a pesar de lo anterior, el oxígeno presenta toxicidad la cual que está explicada por su configuración electrónica. Además es esta configuración lo que explica porque se forman especies reactivas. Ejemplos son el oxígeno atómico (O), el ozono (O_3), el oxígeno singulete (1O_2), el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Gutteridge and Halliwell, 1992).

Estas especies químicas tóxicas tendrán un impacto que dependerá de la concentración y del contexto en el que se generen. Bajas concentraciones de estas especies químicas pueden convertirse en estímulos de crecimiento celular, de regulación del ciclo celular, modulación del sistema inmunológico, estimulación del metabolismo celular, etc., pero también son mediadoras de la muerte celular. No todas estas especies químicas poseen la misma reactividad, en este sentido es el $\bullet\text{OH}$ es una de las especies más reactivas (Hansberg 2002).

1.5.2. EL OZONO

Es un gas que deriva del O_2 cuando la radiación ultravioleta de alta energía (que corresponde de 250 a 290 nm de longitud de onda) ó la energía eléctrica escinde los enlaces covalentes de la molécula de O_2 . Así se forma oxígeno atómico que rápidamente se une con el O_2 adyacente originando O_3 .

El ozono se forma en la estratosfera por efecto de los rayos ultravioleta. De esta forma los rayos son absorbidos en este proceso y no llegan a la superficie terrestre como lo harían sin esta absorción. El ozono en la troposfera es producto de la contaminación fotoquímica del aire ya que se produce en la superficie terrestre por efecto de la luz sobre el NO_2 producto de la combustión de la materia orgánica (Packer, 2000). Este apartado se discutirá más adelante en el capítulo "El ozono como modelo de estrés oxidativo".

1.5.3. EL OXÍGENO SINGULETE

Cada átomo de oxígeno, en el segundo y último nivel de energía, posee un orbital P con un par electrónico y dos orbitales P con un electrón en cada uno. El $^1\text{O}_2$ se origina cuando uno de los dos electrones de los orbitales P cambia de spín al captar energía. Ahora queda una configuración de electrones que según las posibilidades se aparearan inmediatamente (si el cambio de spín resulto contrario al del orbital P adyacente) dejando un orbital P completamente vacío. La otra posibilidad es que sigan desapareados y que el electrón que adquirió energía sólo logró cambiar de spín y no logró migrar a otro orbital P y aparearse. Biológicamente solo tiene importancia la primera posibilidad. Los mecanismos biológicos para la generación de $^1\text{O}_2$ son posibles gracias a pigmentos naturales como las flavinas, la cianocobalamina, el retinol, algunas quinonas y porfirinas ya que estas sustancias pueden presentar excitación electrónica con fotones de entre 430 y 490 nm que corresponden al espectro azul de la luz y también con fotones de luz UVA y transferir la energía al O_2 para formar $^1\text{O}_2$. Algunas especies reactivas pueden generar singuletes como la dismutación espontánea del superóxido y la disociación del peróxido con ácido hipocloroso producido en el estallido respiratorio del sistema inmunológico por los macrófagos. Los efectos tóxicos de esta especie reactiva son menores y limitados por su muy corta vida media (0.5 μs) en las células. Su efecto se concentra en la producción de endoperóxidos, oxidación de bases nitrogenadas y proteínas, inactivación de carotenos y tocoferoles. Estudios como los de Hansberg en 1999 y Packer en el 2000, reportaron la activación de proteínas de choque térmico como la hemoxigenasa 1 en presencia de $^1\text{O}_2$.

1.5.4. ANIÓN SUPERÓXIDO

Es el primero de los intermediarios de la reducción del oxígeno. Se origina mediante la reducción del oxígeno con un solo electrón, evento químico llamado transferencia monoeléctrica. Esta especie resulta ser un anión y un radical al mismo tiempo. Su producción en los sistemas biológicos ocurre en la cadena de transporte de electrones cuando uno de estos, principalmente a nivel de la ubiquinona (coenzima Q), es cedido a un O_2 . También puede ocurrir a nivel del complejo I de la cadena de transporte de electrones (coenzima Q reductasa). De manera que con estas “salidas” electrónicas, se produce aproximadamente un 0.1% de superóxido del total de oxígeno que se ingresa. Existen adiciones menores por parte de catálisis enzimáticas (xantina, lipooxigenasa, peroxidasa). Su toxicidad radica en que puede originar 1O_2 y $\bullet OH$. El $\bullet O_2^-$ libera Fe^{2+} de algunas enzimas (aconitasa, fumarasa, entre otras) dejándolo libre para unión con el ADN o bien irrumpe en vías metabólicas inhibiendo a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de la vía de las pentosas. Existen también enzimas cuya actividad directamente origina la producción de superóxido. Es el caso de las NADPH oxidasas como las NOX1-5. Estas enzimas se encargan de utilizar el poder reductor del NADPH para transferirlo a grupos hem mediante su grupo prostético FAD. En los grupos Hem existe donación de electrones a O_2 generando así superóxido (Dellinger et al., 2001)

1.5.5. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y RADICAL HIDROXILO

Si la reducción continúa con la transferencia de electrones, se adicionará un segundo electrón en los orbitales del oxígeno, teniendo entonces una reducción dielectrónica que formará peróxido de hidrógeno y este al radical hidroxilo. La configuración electrónica del H_2O_2 generó un cambio en el número de enlaces de doble a sencillo. Se debe tener en cuenta que los electrones que se adicionan pueden pertenecer a átomos como el hidrogeno o ser electrones independientes como ocurre en el caso de la adición monoeléctrica del anión superóxido (McCord, 2000).

La mayor fuente de H_2O_2 de origen celular es la reacción química catalizada por la SOD, aunque no es la única vía enzimática de producción. También contribuyen las oxidasas de xantina, de aminoácidos, de hexosas, por citar ejemplos.

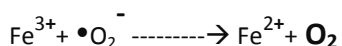
El peróxido de hidrógeno no posee las características electrónicas que le permitan ser clasificado como radical libre pues no posee electrones desapareados, sin embargo, se trata de una especie reactiva que puede fácilmente formar radicales. Aún con su potencial toxico, el H_2O_2 es un componente importante de la fisiología celular. Se ha demostrado que regula algunas fosfatasas inhibiéndolas de forma transitoria en el sitio activo y se conoce su participación en la síntesis de las hormonas tiroideas, maduración y capacitación de espermatozoides, en el estallido respiratorio como sustrato de la mieloperoxidasa y bromoperoxidasa, entre otras.

La reactividad del H_2O_2 es menor que la del $\bullet O_2^-$, no interactúa con moléculas como ácidos nucleicos ni proteínas, salvo con cisteínas en particular por el grupo tiol del cual hablaremos más adelante. La toxicidad del H_2O_2 está en función de que es el principal formador de $\bullet OH$. Este radical libre es de los más reactivos y el que mayor impacto negativo tiene sobre las biomoléculas. Modifica de forma irreversible a las

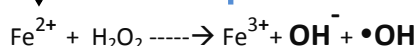
proteínas y DNA y lo hace en proporciones que en ocasiones vuelve imposible la reparación (Fridovich, 1986, Pryor, 1994)

La forma en que ocurre la formación del $\bullet\text{OH}$ es mediante un mecanismo llamado Reacción de Haber-Weiss, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno interactúan para generar al radical hidroxilo, según la descripción de Haber y Weiss en 1934. Esta reacción puede ocurrir de dos formas, la primera sin catálisis química, ocurre espontáneamente pero de forma muy lenta y la segunda con catalizadores metálicos como el Fe, el mecanismo es el siguiente:

PRIMER PASO



SEGUNDO PASO
(Reacción de Fenton)



La reacción neta es:

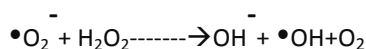


Figura 3. Reacción de Fenton

Si bien todos los radicales tienen propiedades oxidantes, el radical $\bullet\text{OH}$ es el más tóxico a pesar de su vida media tan corta. Esta característica permite conocer su alta reactividad con una extensa variedad de sustratos. El hecho de reaccionar rápidamente le incapacita para migrar grandes distancias como otras especies reactivas por lo que su efecto tóxico inicial está localizado (Pryor, 1994). El $\bullet\text{OH}$ puede oxidar directamente a las bases nitrogenadas y a la desoxirribosa, producir interrupción de la continuidad de la cadena de ADN y generar 8-hidroxiguanina, un indicador de la oxidación del material genético. El mayor daño causado por ataques a aminoácidos está dirigido por el $\bullet\text{OH}$. Los ácidos grasos poliinsaturados, que son componentes estructurales y funcionales de las membranas celulares y organelos membranosos, son altamente susceptibles del ataque oxidativo del $\bullet\text{OH}$. Su configuración electrónica se encuentra formando dobles enlaces que fácilmente pueden ceder electrones. Sin embargo esto genera radicales del carbono que pueden atacar el doble enlace de otro lípido adyacente con lo que se expande el foco de lipoperoxidación. El resultado es la presencia de carbonilos como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal (Hansberg 2002). Por la elevada reactividad del $\bullet\text{OH}$ no hay una forma específica de contrarrestar sus efectos, sin embargo la presencia antioxidantes puede representar una vía de protección contra esta especie reactiva (Packer 1994) siendo medular el mantenimiento de la respuesta antioxidante.

1.6. EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

El sistema de defensa antioxidante está integrado por una variedad de especies químicas que a bajas concentraciones, respecto de las biomoléculas, previenen o ralentizan la oxidación de éstas. Un gran variedad de las biomoléculas pueden ser oxidadas, y un elevado número de estas son unidades estructurales de múltiples tejidos por lo que a éstos se les puede ver como blanco de la oxidación (Lii et al., 1994). Los antioxidantes pueden formar parte de dos grandes grupos, los sistemas enzimáticos que son endógenos (Céspedes y Ela 1996) y los antioxidantes exógenos. No obstante existen moléculas endógenas que no son enzimas y poseen actividad antioxidante. Los antioxidantes pueden actuar en distintas condiciones para prevenir el daño causado por la oxidación (Jakoky y Ziegler, 1990) y en este proceso pueden modificar su estructura por la participación en las reacciones químicas de oxidoreducción pasando de un estado reducido a uno oxidado (Reiter, 1995).

Respecto a las enzimas antioxidantes existen el de la enzima catalasa, la superóxido dismutasa y las dos enzimas del sistema glutatión (la GPx y la Gr) que serán descritas más extensamente en el siguiente capítulo. La catalasa es una enzima cuya mayor concentración está en riñones e hígado, sin embargo, está ampliamente distribuida en todo el organismo. Los sitios con menor presencia de esta son el tejido conectivo y los epitelios aunque en el sistema nervioso central su concentración es tan baja que se considera prácticamente nula. Dentro de la células se ubica en organelos donde la producción de peróxido es elevada como mitocondrias y peroxisomas.

La superóxido dismutasa es expresada extensamente en todas las células del organismo (Fridovich, 1986) sin embargo existen dos tipos diferentes de esta enzima en nuestras células: la MnSOD cuya ubicación es mitocondrial y la Cu-ZnSOD que se encuentra en el citoplasma celular y sitio extracelular. Su actividad cataliza la reacción química de dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrogeno, que como ya se describió anteriormente es una especie reactiva menos activa que el superóxido pero de alta toxicidad por ser la principal fuente de hidroxilo en los sistemas biológicos. Es por esta razón que el peróxido de hidrógeno puede ser neutralizado por sistemas antioxidantes como el de la catalasa y un segundo que resulta de particular interés para los fines de este trabajo, el sistema glutatión.

1.6.1. EL SISTEMA GLUTATIÓN

El tripéptido glutatión (GSH, γ -L-glutamyl-cisteinyl-glicina), forma parte de las respuesta antioxidante y también es miembro del sistema donador de electrones de las glutarredoxinas que más adelante se mencionará, en el contexto de la clasificación de las superfamilia de las tiorredoxinas. Se ha reportado que es el tiol más abundante en los mamíferos (Cooper 1997; (Dringen et al., 2000) y que las concentraciones pueden variar dependiendo de los factores estresantes. En cocultivos de astrocitos y neuronas se han reportado concentraciones mayores en astrocitos respecto a las neuronas. En éstas últimas se han encontrado hasta 40 nmoles/mg de proteína (Dringen et al., 2000).

El GSH reacciona como donador de electrones con los radicales libres mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas. El anión superóxido, el óxido nítrico y el

radical hidroxilo pueden reaccionar con el glutatión por la vía no enzimática, mientras que en la vía enzimática, la Glutatión peroxidasa toma dos moléculas de glutatión como donadoras de electrones y cataliza una reacción de reducción de peróxidos. Los productos al finalizar la reacción química son H₂O más glutatión en su forma oxidada (GSSG). No obstante este disulfido oxidado puede ser revertido a la forma reducida (GSH) mediante otra reacción enzimática catalizada por la Glutatión reductasa (Dringen et al., 2000)

La síntesis de glutatión tiene lugar por una interacción neuroglial (entre neuronas y astrocitos). Estos últimos son las células que proveen a las neuronas de los precursores (glicina, cisteína y ácido glutámico) necesarios para la síntesis del tripéptido.

El glutatión es sintetizado por la acción de dos enzimas, la γ -glutamylcysteinil sintetasa (γ -GCS) y la glutatión sintetasa (GSS) siendo el ATP cosustrato de ambas enzimas, por lo que la síntesis de glutatión depende de gasto de energía para su formación. En un primer paso ocurre la síntesis de glutatión en los astrocitos, esto les permite sintetizarlo para su propia respuesta antioxidante y en un segundo paso, la molécula de glutatión se separa en sus componentes que le son donados a la neurona donde tendrá lugar nuevamente la síntesis de glutatión. En los astrocitos la γ -glutamylcysteinil sintetasa toma como sustratos al glutamato y a la cisteína para formar al dipéptido γ -glutamylcysteinil (γ GluCys). Este metabolito es sustrato de la siguiente enzima, la glutatión sintetasa que cataliza la unión del dipéptido con la glicina, formándose así el tripéptido glutatión (γ -L-glutamyl-cysteinil-glicina).

Una vez formado el glutatión se hidroliza por una ectoenzima ubicada en la membrana plasmática de los astrocitos, la γ -glutamyltranspeptidasa (γ GT). Así el glutatión se separa en un dipéptido diferente al descrito durante la síntesis y está formado por cisteína y glicina (CysGly). La glutamina queda libre y se transporta al interior de la neurona y se propone que el dipéptido CysGly es disociado en sus componentes por una ectoenzima de la membrana neuronal para capturarlos independientemente. De esta forma los componentes del glutatión se encuentran en citoplasma celular donde se sintetizará nuevamente glutatión por sus dos enzimas de síntesis (Dringen et al., 2000, Chen and Swanson, 2003, Himi et al., 2003).

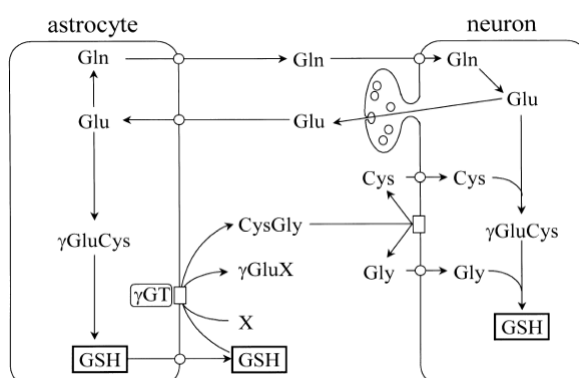


Figura 4. Síntesis de glutatión en los sistemas neurogliales Se propone que la síntesis de glutatión tiene lugar en una interacción entre neuronas y astrocitos donde estos son los proveedores de los precursores para la síntesis del tripéptido. Tomado de Dringen R., Gutterer J.M., and Hirrlinger J., Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species, Eur. J. Biochem. (2000) 267, 4912-4916.

La Glutación Peroxidasa cataliza la reacción química que lleva a la formación de agua a partir de peróxido de hidrogeno, tomando al glutatión como el agente reductor. Este paso genera la forma oxidada del glutatión, sin embargo rápidamente regresa a su forma reducida por efecto catalítico de la Glutación Reductasa. Esta enzima toma al NADPH, que es un potente agente reductor, para romper el enlace disulfuro del glutatión oxidado y generar glutatión reducido y NADP+. Estas reacciones son muy importantes en la respuesta antioxidante, y en un equilibrio de óxido-reducción se produce una proporción mayor de GSH respecto al GSSG, lo que permite al GSH participar como un potente agente reductor en las reacciones enzimáticas donde se involucra. Si bien la participación GSH como agente reductor está relacionada con su concentración, también depende importantemente de su composición molecular, la cual posee, gracias a su residuo de cisteína, un grupo tiol, que es donde reside el poder reductor del GSH.

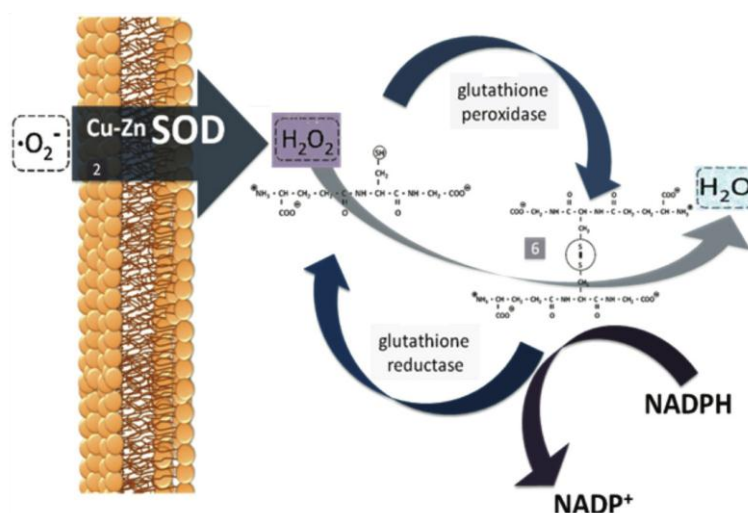


Figura 5. Sistema Glutatión. El mecanismo antioxidante en el que participa el glutatión, se complementa con la participación de dos enzimas que son: la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. La detoxificación de especies reactivas, como el peróxido de hidrógeno, depende también de la presencia del NADPH.

1.6.2. EL GRUPO TIOL

La cisteína se encuentra en sitios conformacionales de las proteínas importantes para el metabolismo celular, pero representa apenas el 3% de los residuos de aminoácido totales del organismo. La cisteína posee en su estructura un grupo tiol, que participa en la formación de los puentes disulfuro y posee además una notable facilidad para donar electrones que le permite oscilar entre un estado reducido y diversos estados oxidados. Estas características en particular hacen que participe en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas como son la estabilidad, el plegamiento, la unión de metales, la catálisis enzimática y la regulación de la actividad protéica.

Cuando el grupo tiol de la cisteína participa de procesos oxidativos, puede adquirir estados de oxidación distintos que son: el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfínico (-SO₂H), el ácido sulfónico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). No todos ellos son estados reversibles, cuando ocurre la oxidación a ácido sulfénico y puente disulfuro puede generarse una reversión mediante moléculas reductoras próximas

pero cuando se forman el ácido sulfínico y sulfónico, no pueden ser reducidos. Para la formación del grupo tiol es determinante la proximidad de otra cisteína con el mismo grado de oxidación para conformar el puente disulfuro (Denu and Tanner, 1998). Con esto se observa que la conformación estructural que genera el grupo tiol depende de su grado de oxidación.

1.6.3. LA CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL GENERADA POR EL GRUPO TIOL

Una característica importante del grupo tiol es que no se ioniza a pH fisiológico y que forma puentes de hidrógeno relativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o de puentes de hidrógeno. Sin embargo, la formación de un enlace fuerte como lo es el enlace covalente (puente disulfuro) puede ocurrir si coexiste proximidad y alineación correcta entre dos cisteínas. Estos enlaces estabilizan la estructura de la proteína, haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas, disminuyendo así, el número de posibilidades de conformación estructural; el caso contrario ocurre en el estado desnaturalizado de una proteína en el que son abundantes las posibilidades conformacionales, la entropía se torna más elevada y energéticamente son más complejas de procesar.

Normalmente en el interior de las células existe un ambiente reductor, que mantiene a los grupos tiol en un estado reducido y permite una conformación proteica específica, sin embargo bajo un estado de estrés oxidativo, el grupo tiol se puede modificar y la estructura de las proteínas que poseen cisteína se altera de tal forma que se puede modificar la forma y la función. Por este motivo el mantenimiento del estado reducido del grupo tiol se mantiene por la presencia de otras proteínas intracelulares que son las tiorredoxinas y el glutatión. En el correlato extracelular frecuentemente se forman puentes disulfuro, que dotan a las proteínas de enlaces fuertes para mantener la conformación con más variaciones que en el sitio intracelular.

La formación de un puente disulfuro en el proceso de síntesis de proteínas cuyo destino es llegar al sitio extracelular ocurre en el retículo endoplásmico (RE), si ocurre un plegamiento incorrecto de las proteínas produce la retención de la misma en el RE y su posterior degradación. En el RE, existe una enzima llamada proteína disulfuro isomerasa (PDI), perteneciente a la superfamilia de las tiorredoxinas, que ayuda al plegamiento correcto en los sitios que poseen puentes disulfuro (Tu et al., 2000). La PDI cataliza reacciones de intercambio tiol:disulfuro, que incluyen la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro (Brighton 1992).

1.6.4. EL GRUPO TIOL Y LOS SISTEMAS DE NADP⁺/TIORREDOXINA Y GLUTARREDOXINA

Cuando ocurre la oxidación de los residuos de cisteína de las proteínas intracelulares, se inicia una reversión hacia el estado reducido mediante mecanismos en donde otros tioles participan, como ocurre con la superfamilia de las tiorredoxinas. Estas son proteínas cuyo sitio activo posee dos residuos de cisteína en una secuencia altamente conservada (tirosina, cisteína, glicina y alanina, prolina, cisteína). Cuando las tiorredoxinas tienen actividad reductora pasan a un estado oxidado que es reversible mediante diversos mecanismos donde participa el NADPH (Arner and Holmgren,

2000). En el sistema NADP+/tioredoxina la presencia del NADPH es determinante para que tenga lugar una catálisis que lleva a cabo la NADP+-tioredoxina reductasa (NTR) en donde la enzima NTR toma al NADPH como donador de electrones y regresa la forma oxidada de la tioredoxina a su forma reducida. Este mecanismo de restauración se involucra en múltiples procesos celulares como la replicación, la reparación de proteínas oxidadas, la replicación del material genético entre otras (Holmgren, 1989). Existen reportes de factores de transcripción involucrados en los mecanismos de oxidación como Fos, y Jun los cuales requieren residuos de cisteínas libres para unirse al ADN. También se sabe que algunas neurotóxicas provenientes de vipéridos, arácnidos e insectos poseen puentes disulfuro intramoleculares que pueden ser reducidos por las tioredoxinas, mecanismo que inhibe la actividad neurotóxica.

Por otra parte en el sistema de la glutaredoxina los componentes pertenecen a la superfamilia de las tioredoxinas por contar con los residuos de cisteína en los sitios altamente conservados y que son los que les permiten tener actividad. Sus miembros son las glutaredoxinas, la glutatión reductasa y el glutatión, estos dos últimos se han descrito en el sistema glutatión.

El mecanismo de actividad de las glutaredoxinas directamente depende de los dos grupos tiol en su sitio catalítico, que están próximos lo cual permite la generación de puentes disulfuro entre ellos (Holmgren, 1989). Las glutaredoxinas, como miembros de la superfamilia de las tioredoxinas pasan del estado reducido al estado oxidado cuando presentan actividad catalítica, es hasta entonces cuando el glutatión tiene participación como donador de electrones a través del hidrogeno de su grupo tiol. El glutatión se encuentra extensamente distribuido en los organismos y como ha sido descrito ya en el apartado del sistema glutatión, la reversión de su estado oxidado depende de la enzima glutatión reductasa (Holmgren, 1989).

Finalmente, estos mecanismos antioxidantes, están acompañados por otros que también son inducidos por el aumento las especies reactivas, para mantener la homeostasis, esta inducción está finamente regulada y depende de la interacción de diversos mecanismos de señalización, como los que se generan por el Factor Nuclear Eritroide-2 (Nrf2).

1.6.5. EL FACTOR NRF2

La inducción de la expresión de numerosos genes de respuesta antioxidante, depende de un factor de transcripción clave, el Factor Nuclear Eritroide-2, Nrf2, por sus siglas en inglés (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor). Este participa en la síntesis de enzimas detoxificantes y antioxidantes mediante su translocación al núcleo celular y unión a secuencias específicas de los llamados Elementos de Respuesta Antioxidante, ARE, por sus siglas en inglés.

El Nrf2 es un factor de transcripción redox sensible por lo que son diversos los agentes oxidantes que son capaces de activarlo. La actividad del Nrf2 depende fuertemente de su translocación al núcleo, sin embargo esta condición se encuentra inhibida por una unión a una proteína citoplásmica que recibe el nombre de Keap1. La formación del complejo Keap1-Nrf2, induce constantemente la degradación de este factor de transcripción por la vía de la ubiquitina-proteasoma, de hecho se encuentra

con relativa facilidad el ARNm para Nrf2 pero la proteína libre (Kobayashi et al., 2006), por lo que la actividad de Nrf2 está altamente regulada.

Como hemos visto, elevación desproporcionada de las especies reactivas permite la interacción de estas con biomoléculas, generando cambios estructurales y funcionales que de no ser contrarrestados por la actividad de la respuesta antioxidante pueden generar alteraciones como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas. Entonces el mantenimiento de la homeostasis depende fuertemente de la capacidad para responder a las variaciones que tienen lugar en el microambiente celular. En este sentido se han descrito mecanismos antioxidantes agrupados en dos fases. La fase 1 es en la que predominan enzimas encargadas de la respuesta a xenobióticos y agentes carcinógenos. La fase 2 se caracteriza por perpetuar las reacciones de la fase 1 y tienen lugar procesos como la conjugación de los agentes agresores con elementos de ligandos endógenos como es el caso del glutatión o el ácido glucurónico (Lee and Johnson, 2004). Ejemplos de las enzimas de la fase 2 son la NADPH-quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), que es una flavoproteína que toma como sustrato a las quinonas que si bien son parte del metabolismo, representan formas oxidadas de diversos precursores, y se encarga de reducir las. La Glutatión S-transferasa (GST) es otra enzima de la fase 2 que se encarga de unir al glutatión reducido con diversas especies reactivas del oxígeno. También está la γ -glutamyl cisteína sintetasa (γ -GCS) que como hemos descrito previamente es la enzima necesaria para iniciar la vía de síntesis del tripéptido glutatión.

Los elementos de la respuesta antioxidante están codificados en secuencias específicas del genoma y estos genes pueden activarse eventualmente por la presencia de moléculas oxidantes como lo son los difenoles, las quinonas, las moléculas arsenicales trivalentes y los metales pesados (Lee and Johnson, 2004).

Existe una interacción entre Keap1 y Nrf2 que forma un complejo del cual depende extensamente la regulación de la actividad de Nrf2. La célula mantiene un estado de equilibrio en las reacciones de oxido-reducción, un cambio sensible en esta homeostasis puede detectarse por la ubicuidad del complejo Nrf2-Keap1 en el sitio intracelular. Se sabe que Nrf2 tiene seis dominios asociados a su regulación negativa, ubicados en su extremo N-terminal. La proteína Keap1 se ha reportado como la responsable de la supresión de la translocación al núcleo de Nrf2 en un 80% y por este motivo la responsable en un 80% de la actividad transcripcional de Nrf2. Keap1 posee cinco dominios llamados canónicos. El primero es el Bric-a-brac, tramtrack, broad-complex/poxovirus zinc finger o bien BTB/POZ. Es una secuencia altamente conservada que se une a factores de transcripción con dedos de zinc. El segundo dominio recibe el nombre de Kelch el cual aparece repetido seis veces, esto origina una estructura de hélice-beta y es el sitio con el cual se une al dominio Neh2 del NRF2. Existe otro dominio donde se ubican los residuos de cisteína responsables del cambio conformacional que disocia la unión Keap1-Nrf2 llamado IVR. El resto de los dominios se reportan como estructurales y de unión al citoesqueleto y son el resto de la región N-terminal y la región C-terminal. Entonces el complejo Nrf2-Keap1 está unido al citoesqueleto en los filamentos de actina por lo que esta última con lleva eventualmente a suprimir la actividad de Nrf2 siendo el sitio de anclaje para Keap1. En la actualidad también se sabe que el complejo Nrf2-Keap1 se forma en la proporción 2:1 (Kensler et al., 2007).

El dominio IVR de Keap1 es rico en residuos de cisteína, y como ha sido descrito previamente, son sitios donde las especies oxidantes y radicales libres pueden interactuar con el grupo Tiol, cambiando la conformación estructural de las proteínas, en este caso de Keap1. El cambio morfológico de esta proteína conlleva a la liberación de Nrf2, y los residuos de cisteína en IVR que han sido relacionados con este proceso son el 183, 273 y 288. Actualmente no se sabe con certeza el cambio morfológico específico que ocurre y se han propuesto en total 7 residuos de cisteína diferentes involucrados en la disociación del complejo Nrf2-Keap (Kensler et al., 2007).

Como hemos estudiado, es el complejo Nrf2-Keap una pieza clave en el inicio de la respuesta antioxidante, sin embargo existen moléculas diversas con actividad antioxidante, cuya síntesis es inducible también, ejemplos de estas moléculas son las melaninas, pigmentos con actividad protectora antioxidante, responsables del pigmento que caracteriza a las células que las producen.

1.7. TIPOS DE MELANINAS, FORMACIÓN Y COMPOSICIÓN

En la actualidad se han descrito los siguientes tipos de melaninas: la eumelanina, la feomelanina, la oximelanina y la neuromelanina.

La eumelanina es un pigmento polimérico insoluble en todos los solventes de color negro o pardo oscuro. Tiene lugar su formación por la polimerización de metabolitos indoles como el 5,6-dihidroxiindol y el ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico. Estos metabolitos son formados mediante catálisis enzimática en una ciclización que produce la tirosinasa a la tirosina para formar dopacromo.

La Feomelanina es un pigmento polimérico soluble en álcalis, de color amarillo-anaranjado o rojo pardo, que contiene nitrógeno y azufre y su formación tiene lugar por la polimerización de cisteinildopas que se forman por la unión de cisteína y metabolitos oxidados de catecolaminas como la dopaquinona.

Las diferencias entre eumelanina y feomelanina son las siguientes:

Tabla 2. Tipos de melaninas

Propiedad de la Melanina	Eumelanina	Feomelanina
Nitrógeno	6-9%	8-10%
Azufre	0-1%	9-12%
Color	Negro o pardo oscuro	Pardo o rojo oscuro
Solubilidad	Insoluble en ácidos y álcalis	Soluble en álcalis
Unidades estructurales	5,6-dihidroxiindoles	1,4-benzotiazinilalaninas
Precusores	Tirosina	Tirosina, cisteína

Existe entre los pigmentos de los organismos, uno de color claro semejante a los pigmentos feomelánicos, sin embargo a diferencia de estos no posee el elemento azufre en sus constituyentes por lo que se clasifica como oximelanina (Napolitano et al., 2000).

Actualmente es reconocido que la formación de eumelanina ocurre por la polimerización oxidativa de metabolitos indoles como el 5, 6- dihidroxiindol (Liu and Simon, 2003); Clancy and Simon 2001 y D'Ischia et al 2005). Estas especies químicas que se unen, forman estructuras tridimensionales que poseen características de radicales polarones (Nicolaus 1997 y 1999), las cuales le permiten a la eumelanina funcionar como pigmento fotoprotector capaz de neutralizar los radicales libres generados durante las reacciones químicas en presencia de rayos de luz de alta energía.

En cambio, el caso de la feomelanina es distinto puesto que sus características benzotiazínicas le otorgan propiedades fotoprotectoras menores. Estudios en este sentido han permitido demostrar que las células que los producen ofrecen fotoprotección que depende de la etapa de síntesis del pigmento. Así mismo la presencia de estos pigmentos es una evidencia de la respuesta de los melanocitos a estímulos endógenos como el ambiente inflamatorio o la señalización química propia de las señales metabólicas, o bien estímulos exógenos como la exposición a radiaciones de alta energía o traumatismos.

1.7.1. FORMACIÓN DE MELANINA

Es reconocido que las melaninas tienen estructuras y propiedades fisicoquímicas distintas entre si, sin embargo tienen un metabolito en común, lo cual permite integrar una vía metabólica de síntesis común a todas. Este metabolito es la dopaquinona (Prota 1993 y Riley 1999).

En el caso de la eumelanina, la síntesis ocurre por la catálisis enzimática mediada por la tirosinasa. Esta enzima toma a la cisteína para generar DOPA, que a su vez, tras reacciones de autooxidación forma dopaquinona. En los mamíferos la tirosinasa es una enzima bifuncional, que convierte la tirosina en dopa y luego en dopaquinona que forma un compuesto cíclico y con posterioridad se oxida para dar lugar a la eumelanina. Es una monooxigenasa que contiene cobre en el orden de dos átomos por molécula y cataliza tanto la hidroxilación del monofenol de la tirosina en dopa como la oxidación de o-difenol, o sea, la dopa en dopaquinona.

Una vez formada, esta quinona muy inestable sufre una reacción de ciclización intramolecular por ataque del grupo amino al sistema o-quinónico para formar un intermediario de 5,6-dihidroxiindol inestable, el leucodopacromo, que con rapidez se convierte en dopacromo, el primer intermediario visible de la melanogénesis. En etapas sucesivas, el dopacromo puede sufrir descarboxilación para producir 5,6-dihidroxiindol (DHI), que con rapidez se oxida a 5,6-indolquinona. Sin embargo la presencia de metales catiónicos con valencia de +2 en la cercanía de la enzima, dará como resultado la formación de otro metabolito carboxilado, el 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Una enzima, la DHICA-oxidasa puede acelerar la oxidación de 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico a ácido 5,6-indolquinona-2-carboxílico, que por autooxidación produce eumelanina.

La presencia de cisteína en el medio, es determinante para la formación de eumelanina o de feomelanina. Cuando el nivel de esta es bajo, como es el caso de los melanocitos que producen eumelanina, la dopaquinona se transforma casi en su

totalidad en dopacromo, que se reordena en presencia de la enzima TRP-2 (proteína 2 relacionada con la tirosinasa o dopacromo tautomerasa) para dar como resultado 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico, 5,6-dihidroxiindol o ambos. Este resultado también se ha observado en el dopacromo cuando iones como el cobre y el hierro se encuentran presentes. Curiosamente se encuentra acumulación de estos metales en células que producen eumelanina (Palumbo et al. 1991).

Se ha asociado en la actualidad a la tirosinasa con la aceleración de la oxidación de 5,6-dihidroxiindol, mientras que se asocia a las enzimas relacionadas con la tirosinasa (TRP's) con la oxidación del 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (Kobayashi et al., 1994). Experimentos recientes indican que el 5,6-dihidroxiindol, como así también el 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico, pueden oxidarse por el sistema peroxidasa-peróxido de hidrogeno (Prota 1993), que muestra una eficiencia catalítica con estos derivados del indol notablemente más elevada respecto de la tirosinasa (D' Ischia M, Napolitano A, Prota G, 1991). La peroxidasa también se detectó en diversos compartimentos de melanocitos (Shibata et al., 1993) y las concentraciones más altas de actividad peroxidasa se asocian a los melanosomas en los estadios II y III, en los que comienzan a manifestarse la acumulación de pigmento. Estos resultados confirman la función fundamental de las peroxidases en la melanogénesis (Okun, 1996).

La formación de feomelanina depende en especial de la cantidad de cisteína presente. La formación de la cisteinildopaquinona permite la formación de los metabolitos benzotiazínicos que polimerizarán a feomelanina (Napolitano et al., 2000).

En términos generales la eumelanina está formada por heteropolímeros insolubles de especies químicas como índoles, ácidos pirrocarboxílicos, leucodopacromo y unidades de dopa en varias etapas de oxidación (Zeise 1994).

Con respecto a sus componentes índoles, estos se unen de formas específicas. El 5, 6-dihidroxiindol en las posiciones 2, 4 y 7 y el 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico en las posiciones 4 y 7. La cantidad relativa de cada uno de los dos tipos de estructura depende sobre todo de la relación de formación de 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico respecto de 5,6-dihidroxiindol en el reordenamiento del dopacromo que está bajo control genético y epigenético (Pawelek, 1991).

Una característica más inusual de la eumelanina es su señal de resonancia paramagnética electrónica que denota propiedades de radicales libres inestables (Prota, 1980). Si se considera el esqueleto de polihidroxiindol de la eumelanina se puede observar que el pigmento nativo es relativamente inestable y muy susceptible a las modificaciones mediadas por radicales del oxígeno, en especial el peróxido de hidrógeno que suele generarse en la epidermis cuando se produce el estrés oxidativo. Además de estas moléculas que contribuyen a la formación de melanina existen otros metabolitos importantes en su formación.

1.7.2. METABOLITOS RELACIONADOS CON LA MELANINA

Existen en las células que producen pigmentos melánicos, otros metabolitos que se relacionan y son melanógenos urinarios de la misma familia que la cisteinildopa: 5-S, 2-S, 6-S y 2,5-S-S dicisteinildopa (Rorsman and Pavel 1990). Estos están relacionados con la biosíntesis de la feomelanina (Ito, 1992).

Se ha visto con el respecto a de estos metabolitos que el 5,6-dihidroxiindol es un inhibidor potente de la peroxidación lipídica (Schmitz et al., 1995) inducida por la radiación UV y que presenta propiedades antioxidantes (D'Ischia et al. 1995; Napolitano et al. 1996).

El 5,6-dihidroxiindol también tiene efectos inhibidores sobre la peroxidación del ácido araquidónico el cual es catalizado por las lipooxigenasas, 5,6-dihidroxiindol tiene efectos inhibidores. Este es un primer paso en las reacciones inflamatorias (Napolitano et al., 1993) mediante un mecanismo que probablemente implica la activación de la lipooxigenasa.

También se ha observado que en condiciones de fotoexcitación el 5,6-dihidroxiindol y el 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico experimentan fotólisis con generación de radicales de semiquinona (Koch and Chedekel, 1987). En el caso del 5,6-dihidroxiindol, la semiquinona resultante puede interactuar con el oxígeno y las especies relacionadas para formar oligómeros hidroxilados que pueden copolimerizarse para originar mezclas de pigmentos similares a la melanina (Prota G et al. 1998). De esta manera, el 5,6-dihidroxiindol y el 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico pueden contribuir en forma significativa a proteger a la piel de los daños de la luz UV, mediante la eliminación de las especies reactivas del oxígeno y la producción de cantidades adicionales de pigmento protector.

Hasta el momento hemos estudiado que los pigmentos protectores tienen actividad protectora en las células que los forman, así otro pigmento de la misma familia, la neuromelanina, ha sido estudiado por sus propiedades neuroprotectoras y su relevancia en procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Parkinson.

1.8. NEUROMELANINA

La neuromelanina es un pigmento que se encuentra en sistema nervioso central, muy parecido a las otras melaninas, que se forma a partir de procesos de oxidación de la dopamina, sin embargo algunos estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear, indican que pudieran haber otros precursores (Double et al., 2000). Su biosíntesis tiene lugar en el mesencéfalo, específicamente en la sustancia nigra y en el locus coeruleus siendo estos dos sitios donde mayormente se produce. (Cotzias et al., 1964, Graham, 1979) Se puede encontrar en la sustancia nigra desde el tercer año de vida, pero su concentración no es la misma de forma lineal a lo largo de los años ya que se acumula a partir de entonces (Zucca et al., 2004).

Existen trastornos neurodegenerativos como la Enfermedad de Parkinson donde la síntesis de neuromelanina, está alterada como puede observarse en preparaciones histológicas de la sustancia nigra en donde el hecho más evidente, es

una pérdida del color oscuro característico de esta región (Hirsch et al., 1988, Faucheux et al., 2003b). Con esto se puede sugerir que la neuromelanina, su metabolismo y las neuronas que la producen juegan un papel importante en la fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson y adquieren relevancia junto al estudio de aquellos factores involucrados con la progresión de esta enfermedad.

Estructuralmente, la neuromelanina es un complejo multimérico parecido a la organización tridimensional de la eumelanina pero se dispone en multicapas como ocurre con el grafito, se encuentra contenida en vesículas citoplásmicas, a menudo con una doble membrana y frecuentemente estas vesículas rodean al núcleo celular. Al menos una quinta parte de la neuromelanina humana es de naturaleza lipídica, siendo éstos, lípidos poliinsaturados poco volátiles y de bajo contenido en oxígeno (Zecca et al., 2000). Mediante técnicas experimentales (hidrólisis ácido yodhídrico y degradación por permanganato de potasio) se han identificado también cualidades que presentan los otros dos pigmentos ya mencionados, la eumelanina y la feomelanina y son la presencia de grupos alifáticos, grupos índoles y benzotiacina (Carstam et al., 1991).

Estas características dotan a la neuromelanina de una elevada capacidad para interactuar con diversos compuestos inorgánicos y orgánicos (Zecca et al., 2001), ejemplos son iones metálicos como zinc, cobre, manganeso, cromo, cobalto, mercurio, plomo, cadmio, hierro (Swartz et al., 1992, Zecca and Swartz, 1993, Zecca et al., 1994, Gerlach et al., 1995) pesticidas, MPTP (1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Zecca et al., 2001), paraquat, entre otros; estas sustancias representan un riesgo importante para las neuronas por ser altamente tóxicos. Lo anterior permite sugerir que la neuromelanina actúa como agente modulador de la toxicidad dentro de las neuronas que la están produciendo. En particular en el caso de la interacción de la neuromelanina con el hierro, experimentos de espectroscopía de absorción de rayos X de estructura fina (Kropf et al., 1998) y espectroscopía de infrarrojos (Bridelli et al., 1999) muestran que esta interacción debe su intensidad al sitio en donde ocurre la unión, el hierro se une a los átomos de oxígeno de los grupos OH del anillo catecol de la ultraestructura del pigmento. Además la neuromelanina tiene un grado de saturación con hierro oxidado (Fe^{3+}) de aproximadamente 50% en condiciones fisiológicas, lo cual que permite la suficiente disponibilidad de pigmento para interactuar con variaciones en la cantidad de hierro u otros compuestos tóxicos asegurando así, la homeostasis celular (Swartz et al., 1992). Sin embargo, cuando las concentraciones de hierro neuronal superan la capacidad de saturación de la neuromelanina, esta no puede contenerlos y quedan libres, generando así las condiciones para que el hierro libre pueda participar de reacciones de oxidación y reducción que derivarán en la formación de OH y las consecuencias oxidativas que este origina (Zucca et al., 2004). Finalmente se puede sugerir que el estrés oxidativo es necesario para la formación de neuromelanina. Por lo tanto, resulta importante el proceso metabólico mediante el cual se sintetiza este pigmento, es decir su mecanismo de biosíntesis.

1.8.1. BIOSÍNTESIS DE NEUROMELANINA

A pesar de muchos trabajos sobre este tema aún no está claro si su biosíntesis puede corresponder a una síntesis enzimática o una vía de autooxidación. La enzima tirosinasa se ha sugerido como una enzima responsable en la biosíntesis de neuromelanina desde que su ARNm se observó en humanos en la sustancia nigra y porque el promotor de la tirosinasa está activo durante todo el desarrollo del cerebro de ratón, en particular en la sustancia nigra del cerebro adulto (Foley JM, Baxter D, 1958; Ikemoto K et al., 1998). La tirosinasa está involucrada en la oxidación de tirosina en la biosíntesis de eumelanina, cataliza la conversión de tirosina a DOPA-quinona. La DOPA se puede formar indirectamente por una reacción de oxidación-reducción entre DOPA-quinona y ciclodopa, dando como producto una ciclación de DOPA-quinona. Estos metabolitos están relacionados también con la síntesis de neuromelanina. Sin embargo, otras referencias no confirman la presencia de tirosinasa en las neuronas del mesencéfalo (Foley JM, Baxter D, 1958; Ikemoto K et al., 1998). Por otra parte, los albinos (que carecen de la tirosinasa funcional) poseen neuronas productoras de neuromelanina sin alteraciones (Foley and Baxter, 1958, Ikemoto et al., 1998).

Otras vías enzimáticas se han propuesto para la síntesis de neuromelanina, como la tirosina hidroxilasa (TH); la oxidación mediada por DA en presencia de cisteína, genera derivados tioéter de DOPA que son precursores de la síntesis de neuromelanina (Haavik, 1997). La Cox-2 también llamada prostaglandina H sintasa (sintasa ya que su reacción enzimática no requiere ATP (Simmons, 2013)) (Gris 2009) ha sido propuesta como una enzima involucrada en biosíntesis de neuromelanina. Se propone que esta enzima, ubicada en la membrana mitocondrial, tiene actividad peroxidasa y podría mediar la oxidación de la dopamina a una quinona, mediante un ciclaje interno y la adición de un grupo amino en el anillo aromático formando así un derivado indol llamado dopaminocromo, este puede transformarse en aminocromo, quinona que se ha identificado como principal componente de la neuromelanina (Mattammal et al., 1995).

En resumen, actualmente no hay un acuerdo respecto a la función que estas enzimas desarrollan en el proceso de síntesis de neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, además de que existen evidencias para la síntesis de este pigmento desde la vía de síntesis no enzimática (Bridelli et al., 1999, Double et al., 2000) como lo indican estudios donde se ha observado la autooxidación de catecoles a quinonas (Fornstedt et al., 1986).

En experimentos recientes se trataron ratas con DOPA para que ésta llegara a la sustancia nigra y en células cultivadas de una línea de feocromocitoma (PC12), en ambos casos se demostró que la DOPA rápidamente fue convertida en dopamina en el citoplasma. En este modelo también se presentó un pigmento que tenía una composición química idéntica a la neuromelanina de humanos, que además estaba localizado en vesículas características rodeados por una doble membrana, como ocurre naturalmente con los gránulos de neuromelanina. La formación del pigmento, estimulado por DOPA, pudo ser bloqueada por un tratamiento con desferrioxamina, un quelante de hierro, lo que indica que el hierro está involucrado en la oxidación de los precursores citosólicos que conduce a la síntesis de neuromelanina (Zucca et al., 2004). Además la síntesis de neuromelanina puede ser bloqueada por una

sobreexpresión de los transportadores vesiculares sinápticos de monoaminas tipo 2 (VMAT2), que secuestran monoaminas desde el citoplasma hacia las vesículas sinápticas para su almacenamiento y posterior liberación como neurotransmisor (Liu and Edwards, 1997).

1.9. LA EXPOSICIÓN A OZONO COMO MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO

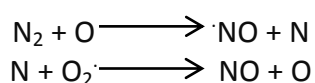
El ozono es un gas oxidante producto de la contaminación fotoquímica del aire presente en las grandes ciudades y es uno de los gases más tóxicos para los seres humanos, causa daño epitelial y aumento de la permeabilidad celular, produce inflamación intermitente y persistente, además de que genera agudización de enfermedades pulmonares crónicas como el asma.

Organizaciones internacionales han catalogado a este gas como un serio problema de salud pública, ejemplos son la U.S. Environmental Protection Agency (EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Europea. Las concentraciones actuales de ozono troposférico en las zonas urbanas de todo el mundo, tiene origen en la fotocontaminación que ocurre con la combustión incompleta de combustibles fósiles en motores de vehículos automotrices e industrias para la generación de energía eléctrica. Se forma a partir de óxidos de nitrógeno. Es uno de los productos del proceso de conversión. Las reacciones en fase gaseosa son dependientes de la luz.

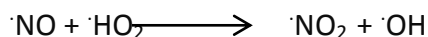
La relación que existe entre el desarrollo de enfermedades y exposición a ozono se puede demostrar cuantitativamente mediante trabajos de toxicología con modelos animales de exposición a ozono. De hecho ya han sido realizados trabajos en este sentido; sin embargo la exposición a la que se exponen los seres humanos de las grandes urbes es muy variable y depende de factores como las condiciones de luz, viento, concentración de contaminantes precursores al ozono, condiciones meteorológicas diversas, etc. Estas variables son de difícil reproducción en un modelo experimental. Por eso el modelo animal que se usa en este trabajo homologa las condiciones de exposición a ozono entre los habitantes de la Ciudad de México, en donde se sabe que los periodos de fotocontaminación ocurren en un horario de entre las 12 h y 16 h diariamente y que la concentración media es de 0.25 ppm.

Aunque es de reconocer que en la actualidad existen estudios epidemiológicos que asocian la exposición a contaminantes con problemas de salud, no hay suficientes datos experimentales para demostrar los efectos particulares que se presentan en los seres humanos por exposición a ozono por sí solo.

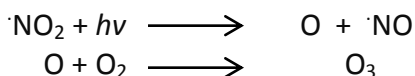
La formación del ozono ocurre mediante reacciones concatenadas en presencia de fotones y gases de combustión de hidrocarburos como el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Este se forma de la siguiente manera:



El $\cdot\text{NO}$ es oxidado en la atmosfera a $\cdot\text{NO}_2$ o bien es producto de la reacción con el radical hidroperoxilo,



Para la formación de ozono el $\cdot\text{NO}_2$ puede escindirse en presencia de fotones de la siguiente forma



Con lo anterior podemos observar que la formación de ozono es secundaria a las reacciones fotoquímicas y los productos de la combustión. Adicionalmente las condiciones donde existe una temperatura elevada, facilitan las reacciones químicas para la formación de O_3 .

Este gas es muy poco soluble en agua (Sandstrom, 1995) y cuando se encuentra en contacto con alguna fase líquida se descompone para producir peróxido de hidrógeno, anión superóxido, y radicales hidroxilo (Victorin, 1992). Aunque no es en sí un radical libre, provoca la formación de éstos en los sistemas biológicos generando así, efectos sensibles de ser cuantificados (Pryor, 1994).

1.9.1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A OZONO

El impacto de la exposición de este gas entre los seres humanos va en función del número de personas expuestas y la concentración del gas en los momentos de mayor producción de éste. Datos epidemiológicos desde 1979 publicados por la organización estadounidense National Ambient Air Quality Standard indican como valor máximo tolerado de ozono 0.12 ppm de concentración durante un promedio de 1 hora y que este valor se ve por encima de lo recomendado al menos una vez al año. Sin embargo, se calcula que más de la mitad de los residentes de Estados Unidos viven en zonas donde las concentraciones están cerca o por encima de la norma (Kleeberger, 1995). Además han sido reportados datos semejantes entre grandes ciudades como Japón, ciudades europeas y de América del Sur (Bromberg and Koren, 1995).

La distribución de este gas tóxico depende de las condiciones atmosféricas como las masas de aire en movimiento, las horas con mayor temperatura del día y los meses de primavera o verano (EPA de los EUA., 1996a). La hora y el lugar de las actividades al aire libre son los principales determinantes de la exposición de un individuo a ozono (Vostal, 1994). La distribución de este gas depende también de las concentraciones de sus precursores como el $\cdot\text{NO}_2$, que es el principal compuesto originado en la combustión de hidrocarburos. Este gas es del que mayormente depende la formación de ozono, aunque también es generado en interiores por motores de gas, estufas, calentadores de agua y humo de tabaco (Berglund, 1993).

Uno de los primeros estudios que logro relacionar, mediante una explicación bioquímica y matemática la relación entre los efectos biológicos y la concentración de la exposición a ozono fueron Miller y Menzel (1984) en donde calculan que el sitio de máxima exposición del tejido pulmonar es la región centroacinar (Miller et al., 1978) y se reveló que el 50% del ozono inhalado se elimina de las regiones revestidas por moco (Gerrity et al., 1988) y que la absorción puede ocurrir prácticamente en toda la superficie del tracto respiratorio (Patra et al., 1984). Por esto el daño puede muy

extenso. La mayor parte de las reacciones químicas que generan daño directo al tejido pulmonar son a través del mecanismo de formación Criegee ozónido (Figura 1) (Pryor, 1994), el cual conduce a la formación de especies reactivas como el peroxilo y el hidroxilo. Como ya fue comentado estos son las especies reactivas mayormente responsables de los cambios oxidativos que ocurren en las biomoléculas.

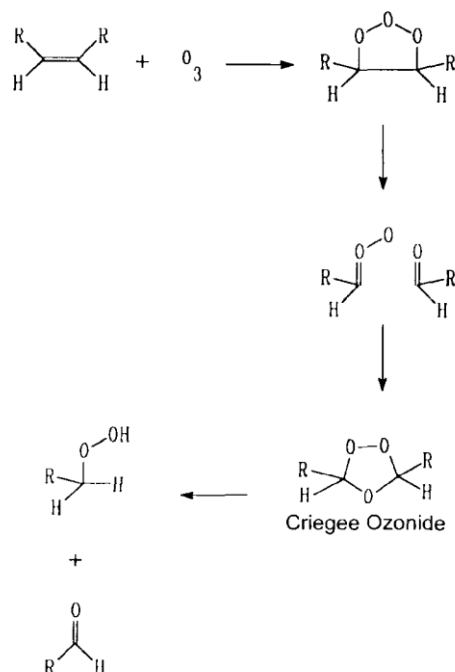


Figura 6. Criegee ozónido. Tomada de Gilbert y Colton, Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach, 2002

1.9.2. OXIDACIÓN LIPÍDICA Y PROTEICA POR EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A OZONO

La lipoperoxidación inicia la serie de eventos que puede perpetuar la formación de radicales libres, tanto in vitro como in vivo; este fenómeno concatenado involucra la presencia del ozónido Criegee (Menzel, 1970, Roehm et al., 1971, Pryor, 1994). Existen dos mecanismos bioquímicos principales para que se lleve a cabo la lipoperoxidación. En el primero, un radical de carbono se separa del alqueno cuando el ozono reacciona formando al 1,2,3-trioxolano (Menzel, 1970), esto lleva a una ruptura homolítica de uno de los enlaces y genera dos radicales libres. En el segundo mecanismo reacciona con donadores de electrones tales como GSH para generar un tiol oxidado y un radical anión de O₃ que reacciona entonces con un protón para formar el ion hidroxilo y oxígeno molecular.

Los radicales que se producen en las reacciones que son producto de la interacción del O₃ con las biomoléculas del tejido pulmonar corresponden al 10%. Cuando la interacción del ozono ocurren con fosfolípidos que se encuentran en las proximidades de la interfaz acuosa de la mucosa, se pueden formar hidroxihidroperóxidos que a su vez forman H₂O₂ (Pryor, 1994). Como sabemos esta especie reactiva es el principal productor de •OH el cual tiene un impacto negativo potencial (Freeman and Mudd, 1981) en un radio efectivo de toxicidad.

1.9.3. TOXICIDAD DE LA EXPOSICIÓN A OZONO

Existe un halo de expansión de los efectos tóxicos del ozono. En este son responsables los fosfolípidos de membrana poliinsaturados que fueron oxidados por los subproductos del gas. Estos ozónidos pueden mediar la oxidación de moléculas adyacentes rápidamente. En estudios *in vitro* se logró observar que el linoleato de metilo-9,10-ozónido posee mayor reactividad que incluso el hidroperóxido de cumeno, un agente químico usado en modelos experimentales de peroxidación (de Vries et al., 1994).

Existen otros mediadores responsables del halo de expansión de la toxicidad del ozono como el 4-hidroxinonal. Este es el aldehído más citotóxico generado mediante lipoperoxidación y tiene características anfipáticas por lo que su actividad no está limitada a la sitio donde se formó, sino que puede atravesar extensas regiones intracelulares o extracelulares. Además su vida media es más larga que la de las especies reactivas que le dieron origen, por lo que tiene un gran número de blancos en la propia célula o fuera de ella (Danielson et al., 1987, Esterbauer et al., 1991). El 4-hidroxinonal ha sido tomado como biomarcador de la peroxidación lipídica, sin embargo, en estadios fisiológicos, en el flujo sanguíneo venoso se encuentran concentraciones que oscilan entre 0.1 y 1.4 μM (Strohmaier et al., 1995) y se le han reconocido funciones diversas en el metabolismo como la regulación del ciclo celular, modulación de la actividad de la adenilatociclasa, incremento de la actividad de la fosfolipasa C (Esterbauer et al., 1991), incremento del calcio intracelular (Carini et al., 1996).

Por otro lado, la exposición a ozono induce la activación de los genes de varias proteínas como la proteína inflamatoria de macrófagos-2 en el pulmón de la rata. La presencia de esta proteína trae como consecuencia el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón (Haddad et al., 1995). Se puede hablar entonces de un aumento gradual de la respuesta inflamatoria pero la generación de daño ocurre desde el inicio de la exposición (Bhalla, 1996).

La toxicidad de la exposición a ozono queda distribuida a extensas partes del organismo cuando los elementos formes de la sangre transportan a los ozónidos. Cuando el grupo hemo sufre modificaciones oxidativas se forman cuerpos de Heinz, agregados insolubles de hemoglobina que son indicadores de que un estado de estrés oxidativo se ha establecido en el eritrocito. La formación de cuerpos de Heinz se observó en eritrocitos de ratas tras la exposición a ozono (Menzel, 1970). La presencia de ozónidos en estas células es un determinante para la extensión de la toxicidad de la exposición a ozono y de esta forma alcanzar regiones sistémicas y aún más aquellas con mayor irrigación.

La contaminación de las grandes urbes, es un apartado que debe seguir teniendo abordaje en el campo correspondiente y con ello, disminuir entre otros contaminantes al ozono troposférico ya que existe la evidencia de su participación como generador importante de especies reactivas y de otras consecuencias como las descritas por trabajos de nuestro laboratorio en donde se ha demostrado en ratas que la exposición crónica a bajas dosis de ozono, causa neurodegeneración en la sustancia nigra.

2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del estrés oxidativo sobre la formación de neuromelanina presente en sustancia nigra de ratas expuestas a O₃.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que las concentraciones de las especies de glutatión (GSH, GSSG y glutatión total) en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono, presentan alteraciones durante la pérdida del equilibrio redox.
2. Dilucidar si las alteraciones que existen en las concentraciones de glutatión se deben a alteraciones en la expresión de la enzima limitante para la formación de glutatión (la γ -GCS) mediante técnicas de inmunohistoquímica en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono.
3. Estudiar si las alteraciones en la expresión de la γ -GCS son producto de cambios en la translocación y expresión del NRF2 (factor inductor de la síntesis de elementos de la respuesta antioxidante) durante el estado de estrés oxidativo en ratas expuestas a ozono.
4. Estudiar si la actividad antioxidante endógena está alterada en ratas expuestas a ozono mediante la cuantificación de la actividad las enzimas del Sistema glutatión, la GPx y la Gr en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono.
5. Estudiar los cambios de la 3-nitrotirosina como marcador de estrés oxidativo en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono.
6. Estudiar si la exposición a ozono genera cambios en la expresión de la Trp-2, enzima asociada a la síntesis de neuromelanina, en la sustancia nigra de ratas.
7. Demostrar que el estado de estrés oxidativo es capaz de generar alteraciones en la formación de neuromelanina de la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono.

3. ANTECEDENTES

Aunque existen múltiples estudios que explican los diversos procesos moleculares involucrados en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, aún nos encontramos lejos de comprender la totalidad de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en su desarrollo. Estas enfermedades cursan con un estado de estrés oxidativo, el cual participa en la formación y acumulación de agregados de proteínas insolubles (Merlini and Bellotti, 2003), esto induce un proceso de degeneración progresiva de las células neuronales (Bove et al., 2006) y de alteraciones en la glía. Los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en estas enfermedades crónicas así como su prevalencia en la población de edad avanzada, han generado la necesidad de conocer con mayor detalle la evolución de los procesos neurodegenerativos como los que ocurren en la Enfermedad de Parkinson, que se presenta hasta la etapa adulta del individuo por lo que el impacto social es alto.

Según informes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en nuestro país, esta enfermedad Ocupa el segundo lugar entre las enfermedades neurodegenerativas en México, solamente es superada por la Enfermedad de Alzheimer y representa la cuarta causa de consulta en este instituto. Es un trastorno irreversible y progresivo que inicia en promedio a los 55 años con una posibilidad de duración media de 10 a 13 años. Los datos también indican que tiene una prevalencia que va de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes por año. Con base en lo anterior podemos concluir que esta enfermedad representa un importante problema de salud en México. Por otro lado en EEUU, la prevalencia de la Enfermedad de Parkinson en mayores de 60 años se encuentra entre 0.3% y 1% y la incidencia resulta en 13.4 por cada 100,000 habitantes por año. Respecto al resto del mundo, se ha calculado que afecta a 1% de la población mundial mayor de 60 años (Hindle, 2010).

Tomando en consideración lo anterior, se pronostica que por el aumento gradual de la tasa de sobrevivencia, el número de casos afectados por esta enfermedad se incrementará el doble para el año 2030. Por otra parte se tienen reportes que indican una mayor frecuencia de la Enfermedad de Parkinson en hombres, la explicación puede encontrarse en una condición de género, donde los estrógenos podrían estar involucrados en algún grado de protección, aunque esto ha generado controversia. Por lo tanto resulta medular la integración de aquellas hipótesis emergentes con los componentes que actualmente ya han sido identificados en el curso de la Enfermedad de Parkinson, como lo es el estado de estrés oxidativo crónico y el metabolismo oxidativo de la dopamina. Las alteraciones en el metabolismo de este neurotransmisor y en la formación de neuromelanina, durante el estado de estrés oxidativo que está presente en esta enfermedad, aun no son bien conocidas y son un factor clave para dilucidar la fisiopatología y la evolución de la Enfermedad de Parkinson.

3.1. HIPÓTESIS

Si la producción de neuromelanina depende del equilibrio redox en el metabolismo oxidativo de la dopamina, entonces, la pérdida de dicho equilibrio llevará a la formación de quinonas de dopamina y sus metabolitos tóxicos y a la disminución de la formación de neuromelanina en la sustancia nigra de ratas expuestas a ozono.

4. METODOLOGÍA GENERAL

Se utilizaron 78 ratas macho cepa Wistar de entre 250-300 g de peso al momento de inicio de la experimentación. Se mantuvieron en cajas individuales de acrílico transparente con libre acceso a agua y comida en una sala de bioferio acondicionada con aire corriente limpio. Todos los experimentos y cuidados fueron realizados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002 y el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron divididos al azar en 6 grupos experimentales para tratamiento con ozono con una n=13 cada uno. Cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos. El grupo 1 fue expuesto a aire ambiental; el grupo 2 fue expuesto 7 días a ozono; el grupo 3 fue expuesto 15 días a ozono; el grupo 4 fue expuesto 30 días a ozono; el grupo 5 fue expuesto 60 días a ozono y el grupo 6 fue expuesto durante 90 días a ozono. La exposición a este gas se realizó diariamente en una cámara sellada, durante 4 horas a una dosis de 0.25 ppm y a un flujo de 5 litros por minuto. Inmediatamente después de su tratamiento diario, los animales eran devueltos a sus cajas de acrílico. Dos horas después de finalizada la última exposición a ozono, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg / kg intraperitoneal) y se obtuvieron los cerebros para técnicas espectrofotométricas e inmunohistoquímicas. Se tomaron seis animales de cada grupo (36 en total) escogidos al azar los cuales fueron muertos por decapitación; la sustancia nigra fue disecada, procesada y almacenada a -70°C para posteriormente realizar la cuantificación de las concentraciones de glutatión total, glutatión reducido, glutatión oxidado, actividad de las enzimas glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Los siguientes 18 animales fueron perfundidos de forma intracardiaca con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich). En buffer de fosfatos 0,1 M (PBS) a pH 7.4 los cerebros fueron almacenados con formol al 10% durante 24 h e incluidos en parafina. Posteriormente en un micrótopo se hicieron cortes sagitales a nivel de la sustancia nigra de 5 µm de espesor y fueron montados en portaobjetos previamente preparados con Poli-L-lisina (1:10). De cada grupo experimental se tomaron 3 cerebros, y se hicieron 4 cortes sagitales de cada uno, montados según lo ya descrito, para técnicas de inmunohistoquímica. Se utilizó en cada uno de los 4 cortes sagitales de tejidos, uno de los siguientes anticuerpos: enzima γ-GCS (n=3), NRF2 (n=3), 3 nitrotirosina (n=3) y Trp-2 (n=3). Finalmente fue tomado solo un corte de tejido de cada uno de los restantes 4 cerebros de cada grupo (n=4 por grupo experimental) para realizar la técnica de histoquímica que permitiera visualizar neuromelanina mediante el método de reacción argentafín del ácido de nitrato de plata.

4.1. EXPOSICIÓN A OZONO

Los animales fueron colocados diariamente durante 4 h dentro de una cámara sellada conectada a un generador de ozono a un flujo de 5 l/min. El aire de alimentación del convertidor de ozono fue filtrado y purificado y se cuantificó la concentración de ozono con un monitor conectado a la salida del generador de ozono para asegurar una exposición constante de 0.25 ppm del gas. Se utilizó la misma cámara sellada para la exposición del grupo control, la diferencia en este grupo es que se utilizó aire sin ozono.

Tabla 3. Reactivos utilizados

Reactivo	Marca
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	Productos Químicos Monterrey
Fosfato de sodio (Na_2HPO_4)	Fermont
EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 + 2\text{H}_2\text{O}$)	J. T. Baker
Glutación reductasa (Gr)	Sigma-Aldrich
Nicotinamida adenina dinucleótido 2-fosfato reducido ó NADPH ($\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{Na}_4\text{O}_{17}\text{P}_3 + \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Acido Ditionitrobenzoico ó DTNB ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$)	Sigma-Aldrich
L-Glutación oxidado ó GSSG ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_2$)	Sigma-Aldrich
4-vinilpiridina ($\text{C}_7\text{H}_7\text{N}$)	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrógeno al 30% (H_2O_2)	J. T. Baker
Azida de sodio (NaN_3)	
Recuperador de antígenos	Biocare Medical
Trizma HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 + \text{HCl}$)	Sigma-Aldrich
Cloruro de sodio (NaCl)	Fermont
Tween 20	Sigma-Aldrich
Xilol ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$)	Fermont
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$)	J. T. Baker
Kit de inmunohistoquímica	Biocare Medical
Hematoxilina	ScyTek
Entellan	Merck
Acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} + 3\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Nitrato de plata (AgNO_3)	Merck
Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Nuclear Fast Red	Sigma-Aldrich

LISTA DE ABREVIATURAS

15 d	Grupo de 15 días de tratamiento con ozono
30 d	Grupo de 30 días de tratamiento con ozono
60 d	Grupo de 60 días de tratamiento con ozono
7 d	Grupo de 7 días de tratamiento con ozono
90 d	Grupo de 90 días de tratamiento con ozono
3-NT	3 - nitrotirosina
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
GPx	Glutación peroxidasa
Gr	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GT	Glutación total
KH_2PO_4	Fosfato de potasio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Na_2HPO_4	Fosfato de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido 2-fosfato reducido
NaN_3	Azida de sodio
NM	Neuromelanina
nm	Nanometro
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
prot	Proteína
Trp-2	Dopacromo tautomerasa
γ -GCS	γ -glutamilcisteinil sintetasa
μl	Microlitros

4.2. GLUTATIÓN TOTAL, GLUTATIÓN REDUCIDO Y GLUTATIÓN OXIDADO

El fundamento de la técnica se basa en la coloración que se origina por la reacción que ocurre entre el DTNB que es una molécula oxidada y el GSH. El DTNB se torna amarillo cuando es reducido por el GSH y ésta coloración es sensible de cuantificarse por espectrofotometría a 412 nm. La absorbancia dependerá del grado de coloración amarilla y a su vez, ésta coloración dependerá de la cantidad de GSH que podrá reaccionar con el DTNB oxidado. Para la medición del glutatión total, el GSSG es convertido a GSH mediante la adición de la glutatión reductasa, y éste reducirá al DTNB para generar la coloración que podrá medirse. Para la medición de sólo el GSSG, primero se atrapa todo el GSH con 4 vinilpiridina, quedando en la muestra únicamente GSSG, al agregar la enzima Gr, todo el GSSG se transformará a GSH, y éste será un reflejo directo de la cantidad total de GSSG.

4.2.1. GLUTATIÓN TOTAL

Se obtuvieron las muestras en fresco, se homogenizaron, se almacenaron en buffer de lisis a -70 °C y se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford para normalizar las muestras. Se prepararon los reactivos para un litro del buffer PBS/EDTA (100mM/5mM) de la siguiente forma.

PBS

Se disolvieron por separado 13.609 g de KH_2PO_4 (100mM) y 14.196 g de Na_2HPO_4 (100mM), posteriormente se disolvieron 1.861 g de EDTA (5mM). Una vez disueltas las tres sales se mezclaron, se aforó a 1 litro y se ajustó a pH 8. Después se procedió a preparar la mezcla de reacción con el cofactor para la enzima Glutatión reductasa y el cromógeno tomando NADPH (0.2mM) y DTNB (0.6mM). La cantidad fue calculada en función de la cantidad de tubos experimentales siempre tomando en cuenta 500 μl de mezcla por tubo experimental. Posteriormente se tomaron 0.0012252 g de GSSG para preparar 1 ml de stock a 2mM para generar a la curva estándar. Adicionalmente se preparó la enzima Glutatión reductasa y se diluyó en mezcla de reacción a una proporción de 0.2 μl de enzima por cada 100 μl de mezcla de reacción; a cada tubo experimental se agregaron 100 μl de esta enzima diluida justo antes del momento previo a la lectura de 412 nm.

La siguiente tabla muestra la forma de construir la curva estándar, el proceso para las muestras experimentales y el blanco.

Tabla 4. Procedimiento para medición de glutatión total

	nanomoles de GSSG (puntos de la curva)	μl del stock de GSSG (2mM/ml)	μl del PBS/EDTA	Mezcla de reacción e incubación	Mezcla de reacción con enzima
1	0	0	500	400 μl de mezcla de reacción e incubar 5 min a 37° C	Agregar enzima diluida (100 μl /0.2 μl por tubo) agitar en vórtex y leer a 412 nm inmediatamente
2	10	5	495		
3	20	10	490		
4	30	15	485		
5	40	20	480		
6	50	25	475		
muestras		0	475		
blanco		0	500		

Cada tubo fue vaciado en su correspondiente pozo de lectura, se agregó la enzima diluida (100 µl de mezcla de reacción / 0.2 de enzima Gr por tubo) y se mezcló con la pipeta en cada pozo. Inmediatamente se realizó la lectura a 412 nm (espectrofotómetro Epoch, Biotek); el proceso de mezcla no duró más de 2 minutos.

4.2.2. GLUTATIÓN OXIDADO

Se obtuvieron las muestras en fresco, se homogenizaron, se almacenaron en buffer de lisis a -70 °C y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford para normalizar las muestras. Se prepararon los reactivos para un litro del buffer PBS/EDTA (100mM/5mM) de la siguiente forma: se tomaron y disolvieron por separado 13.609 g de KH₂PO₄ (100mM) y 14.196 g de Na₂HPO₄ (100mM), posteriormente se tomaron y disolvieron 1.861 g de EDTA (5mM). Una vez disueltas las tres sales se mezclaron, se aforó a 1 litro y se ajustó a pH 8. Después se procedió a preparar la mezcla de reacción con el cofactor para la enzima Glutatión reductasa y el cromógeno tomando NADPH a una concentración de 0.2mM y DTNB a una concentración de 0.6mM. La cantidad fue calculada en función de la cantidad de tubos experimentales siempre tomando en cuenta 500 µl de mezcla por tubo experimental. Posteriormente se tomaron 0.0012252 g de GSSG para preparar 1 ml de stock a 2mM para generar a la curva estándar. Adicionalmente se preparó la enzima Glutatión reductasa y se diluyó en mezcla de reacción a una proporción de 0.2 µl de enzima por cada 100 µl de mezcla de reacción; a cada tubo experimental se agregaron 100 µl de esta enzima diluida justo antes del momento previo a la lectura de 412 nm.

La siguiente tabla muestra la forma de construir la curva estándar, el proceso para las muestras experimentales y el blanco.

La siguiente tabla muestra la forma de construir la curva estándar, el proceso para las muestras experimentales y el blanco y la incubación de todos tubos con 4-vinilpiridina.

Tabla 5. Procedimiento para medición de glutatión oxidado

	nanomoles de GSSG (puntos de la curva)	µl del stock de GSSG (2mM/ml)	µl del PBS/EDTA		Mezcla de reacción e incubación	Mezcla de reacción + enzima
1	0	0	500	agregar 2 µl de 4-vinilpiridina, agitar en vórtex 1 min e incubar 50 min en oscuridad	400 µl de mezcla de reacción e incubar 5 min a 37° C	Agregar Mezcla de reacción/enzima (100 µl/0.2 µl por tubo) agitar en vórtex y leer a 412 nm inmediatamente
2	10	5	495			
3	20	10	490			
4	30	15	485			
5	40	20	480			
6	50	25	475			
muestras	0	0	475			
blanco	0	0	500			

La 4-vinilpiridina fue agregada en cada tubo experimental, éstos se agitaron en el vórtex por 1 minuto; se confirmó la presencia de un precipitado en cada caso, resultado de la interacción con el GSH presente en el tejido. Después los tubos se incubaron durante 50 min en oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 400 µl de mezcla de reacción y se incubaron durante 5 minutos a 37° C. Cada tubo fue vaciado en su correspondiente pozo de lectura, después se agregó la mezcla de reacción con enzima (100 µl de mezcla de reacción / 0.2 de enzima Gr por tubo) y se mezcló con la pipeta en cada pozo. Inmediatamente se realizó la lectura a

412 nm; el proceso de mezcla no duró más de 2 minutos. Durante la obtención, cada muestra posee un tamaño y peso diferentes por lo que se hizo una cuantificación de proteínas y con este dato se normalizaron los nmol obtenidos en las muestras experimentales. Para calcular la cantidad de GSH se realizó una resta del GSSG a la cantidad de Glutación Total obtenida previamente.

4.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA

El fundamento de la técnica consiste en la medición de la tasa de desaparición del NADPH mediante espectrofotometría. Se trata de un acoplamiento enzimático en donde la actividad de la glutación peroxidasa será cuantificada al acoplar los metabolitos que produce con otra enzima, la glutación reductasa, ya que también son sustrato de ésta. El resultado es que la actividad de la segunda enzima dependerá de la cantidad de metabolitos que produzca la primera. Se inhibe previamente la actividad de la catalasa con azida de sodio, se administra una cantidad conocida de GSH y peróxido de hidrógeno para inducir la actividad de la glutación peroxidasa. Ésta, se encargará de reducir al H₂O₂ y oxidar al GSH para formar gradualmente un aumento progresivo de las concentraciones de GSSG. Además a la muestra experimental se agregarán desde el inicio, la segunda enzima, la glutación reductasa y su cofactor el NADPH.

La actividad de la peroxidasa, está directamente reflejada por la producción de GSSG y ésta será la referencia para la velocidad en que la reductasa utilice al NADPH, que comenzará a desaparecer. De esta forma la desaparición del NADPH dependerá finalmente de la producción GSSG que como se ha explicado, es una medida de la actividad de la peroxidasa. La desaparición del NADPH será monitoreada a través del tiempo a 340 nm.

Se obtuvieron las muestra de tejido de sustancia nigra en fresco, se homogenizaron, se almacenaron en buffer de lisis a -70 ° C y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford para normalizar las muestras.

Se prepararon los reactivos para un litro del buffer PBS (50mM) a pH 7 tomando y diluyendo por separado 6.8045 g de KH₂PO₄ y 7.098 g de Na₂HPO₄. Una vez diluidas se mezclaron y se aforó a un litro ajustando a pH 7. Adicionalmente se preparó la mezcla de reacción en frío. La cantidad de muestras a procesar se diseñó en múltiplos de 10 para facilitar el proceso técnico.

Tabla 6. Cálculo para mezcla de reacción en la medición de la actividad de la Gpx

800 µl por tubo					
		1 tubo	10 tubos	20 tubos	40 tubos
EDTA	1mM	.372 mg	3.72 mg	7.44 mg	14.88 mg
NaN ₃	1mM	0.065 mg	0.65 mg	1.3 mg	2.6 mg
GSH	1mM	0.0307 mg	3.07 mg	6.15 mg	12.3 mg
NADPH	0.2mM	0.167 mg	1.67 mg	3.34 mg	6.68 mg
Glutación reductasa 2.2 mg de prot/ml 205 U/mg de prot 1.11 ml	1 U/ml	2.2 µl	22 µl	44 µl	88 µl

A continuación fueron preparados los tubos experimentales según se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7. Procedimiento para medición de actividad de la Gpx

	PBS 50 mM	Mezcla de reacción y enzima	Incubación	H ₂ O ₂ (0.3mM)		Lectura
blanco	1000 µl	0	Incubación 5 min a temperatura ambiente	0		Lectura inmediata a 340 nm
inespecífico	100 µl	800 µl	Se incuba con la mezcla de reacción 5 minutos a temperatura ambiente	100 µl	AGITACIÓN RÁPIDA	cada 30 segundos por 10 minutos
muestras	50 µl + 50 µl de muestra	800 µl		100 µl		

Con las lecturas obtenidas se trazó la línea de tendencia, se obtuvo el valor de la pendiente (m) y se le restó el promedio de las pendientes de los inespecíficos; la diferencia fue dividida entre el producto de la constante de disociación del NADPH (6.22) por los µl de la alícuota (50 µl). Los resultados se expresaron en nM de NADPH/min/mg de proteína.

4.4. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA

El fundamento de la técnica es semejante al de la medición de la glutatión peroxidasa, En este caso se monitorea la desaparición del NADPH por efecto de la glutatión reductasa presente en las muestras experimentales. Para esto se satura la mezcla con GSSG y NADPH lo cual asegura la actividad de la glutatión reductasa de la muestra experimental y el consumo de NADPH con su gradual desaparición que será leída a 340 nm.

Para la elaboración del buffer se tomaron y disolvieron por separado 13.609 g de KH₂PO₄ y 14.196 g de Na₂HPO₄ para estas dos sales la molaridad fue de 100mM y se aforó a 1 litro verificando un pH 7.6. La mezcla de reacción se elaboró en frío con el buffer, en función del volumen requerido, considerando que para cada tubo experimental se requirieron 950 µl de mezcla de reacción. Las concentraciones de reactivos para ésta fueron EDTA (0.5 mM), GSSG (1.25 mM) y NADPH a (0.1 mM). Se prepararon en cada pozo de lectura, 10 µl de muestra experimental diluida en 40 µl del buffer (1:5). Se agregaron después 950 µl de la mezcla de reacción al pozo de lectura y se agitó con una pipeta. Inmediatamente después se leyeron a 340 nm cada 30 segundos durante 10 minutos. Con las lecturas obtenidas se trazó la línea de tendencia, se obtuvo el valor de la pendiente (m) y se le restó el promedio de las pendientes de los inespecíficos; la diferencia fue dividida entre el producto de la constante de disociación del NADPH (6.22) por 50 µl de la alícuota. Los resultados se expresaron en nM de NADPH/min/mg de prot.

4.5. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Se eligieron las laminillas con cortes de tejidos que tuvieron sustancia nigra al mismo nivel y se colocaron en una parrilla precalentada a menos de 100 °C de 1 a 2 segundos. Una vez que la parafina se tornó líquida, los cortes de tejido se colocaron en el tren de alcoholes de mayor a menor para la hidratación de los tejidos (xilol 100% por 5 minutos, alcohol-xilol por 3 minutos, alcohol 100% 3 minutos, alcohol 80% 3 minutos, alcohol 70% 3 minutos, H₂O bidestilada 2 lavados de 3 minutos cada uno). Posteriormente se colocaron los cortes de tejido en un vaso coplin con 50 ml de recuperador de antígenos al 10% y se calentaron en la olla de vapor Decloaking Chamber (Biocare). Esta última con agua destilada al nivel de un tercio del vaso coplin y se programó por 20 minutos. Al finalizar, se sumergió el vaso coplin hasta la mitad, en un baño de agua fría durante 15 minutos. Después, los cortes de tejido se lavaron tres veces durante 3 minutos con agua destilada. Para bloquear la actividad endógena de peroxidasa se incubaron los cortes de tejido en un vaso coplin con 50 ml de peróxido de hidrógeno (1:10) durante 8 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar se lavaron 3 veces con agua destilada por 3 minutos. Para permeabilizar se utilizó un vaso coplin con 50 ml de una mezcla de TBS al 10% + tween 20 al 0.2% en donde permanecieron los cortes de tejido por espacio de 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar se realizó un lavado con TBS al 10% + tween 20 (0.02%). Se realizó el bloqueo de proteínas inespecíficas agregando 60 microlitros de bloqueador de proteínas sobre cada corte de tejido. Los cortes se incubaron en cámara húmeda por espacio de 60 minutos a temperatura ambiente. Al término, se aplicaron 70 microlitros de anticuerpo primario sobre cada corte de tejido y se incubaron toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Los siguientes anticuerpos primarios se diluyeron 1:200, Nrf2 (policlonal hecho en conejo, Santa Cruz) Trp-2 (monoclonal de ratón, Santa Cruz), γ -GCS (policlonal de conejo, Santa Cruz) y la dilución para 3-NT (monoclonal de ratón, Chemicon) fue de 1:100.

Una vez transcurrida la incubación del anticuerpo primario, se lavaron las laminillas con TBS al 10% + tween 20 (0.02%) tres veces durante 10 minutos cada vez y se colocaron 70 microlitros de anticuerpo secundario biotinilado sobre cada corte de tejido, luego se incubaron en éstas condiciones por 120 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Transcurridos 120 minutos se lavaron con TBS al 10% + tween 20 (0.02%), tres veces durante 10 minutos, después se colocaron 70 microlitros de estreptavidina acoplada a peroxidasa sobre cada corte de tejido, se incubaron en cámara húmeda por 40 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos 40 minutos las laminillas se lavaron con TBS al 10% + tween 20 (0.02%) durante 10 minutos cada vez. Después se colocaron 50 microlitros de 3-3' diaminobencidina (DAB) en dilución 1:50 sobre cada tejido solo 8 segundos para lavarse inmediatamente después con agua destilada tres veces 10 minutos cada vez. Terminado el lavado se colocaron 70 microlitros de hematoxilina de Mayer durante 5 minutos excepto en el caso de NRF2 en el cual solo se usó por 30 segundos. Pasado este tiempo se lavaron nuevamente con agua destilada tres veces 10 minutos cada vez.

Las laminillas se deshidrataron en tren de alcoholes idéntico al utilizado en la hidratación pero en este caso del alcohol 70% hasta el Xilol 100%, 30 segundos en cada estación de alcoholes y después se montaron; el medio de montaje fue entellan y se cubrieron con cubreobjetos. La observación de las preparaciones se hizo dos días

después con un microscopio Olympus COVER-018 a 40x y se tomaron fotografías con una cámara Evolution VF COLOR adaptada al mismo y al sistema de software Q Capture.

4.6. TINCIÓN DE NEUROMELANINA

Para esta reacción se utilizó la reacción argentafín del nitrato de plata ácido, que consistió en la elección de las laminillas con cortes de tejido sustancia nigra al mismo nivel, que se colocaron en una parrilla precalentada a menos de 100 °C de 1 a 2 segundos para su desparafinado e hidratación en tren de alcoholes usando el método ya descrito. Se utilizaron las siguientes soluciones:

Buffer acetato a 0.1 M a pH 4

0.1 M de ácido acético 164 ml

0.1 M acetato de sodio 36 ml

Solución de trabajo

0.1 M (1.7%) de nitrato de plata en buffer acetato a 0.1 M a pH 4

Solución de lavado

Tiosulfato de sodio al 5%

Solución de contrastado

Nuclear Fast Red en 100 mg de rojo nuclear en 100 ml de sulfato de aluminio al 5%

Para que la reacción argentafín tuviera lugar, las laminillas se mantuvieron en un vaso coplin de vidrio tapado, inmersas en la solución de trabajo en completa oscuridad a una temperatura de 25 °C durante 20 días. Después de 20 días, se lavaron los tejidos con agua destilada, dos veces durante 10 minutos cada vez y después con tiosulfato de sodio al 5% durante un minuto. Se realizaron dos lavados con agua corriente por 10 minutos cada uno. Después se sumergieron los tejidos en la solución con Nuclear Fast Red por espacio de 4 minutos y después se realizaron 5 lavados con agua destilada de 10 minutos cada uno. Se deshidrataron los cortes de tejido en tren de alcoholes y después se utilizaron entellan y cubreobjetos como medio de montaje. La observación de las preparaciones se hizo dos días después con un microscopio Olympus COVER-018 a 40x y se tomaron fotografías con una cámara Evolution VF COLOR adaptada al mismo y al sistema de software Q Capture. El resultado es una tinción marrón oscuro de la neuromelanina que depende del tiempo de inmersión en la solución de trabajo.

4.7. ESTADÍSTICA

Se analizó la presencia o no de homocedasticidad mediante la aplicación de la prueba de Levene para decidir entre una prueba paramétrica o una no paramétrica en el análisis estadístico. Tomando en cuenta el alfa mínimo del 5% (0.05) y los resultados obtenidos en la Prueba de Levene (ver apéndice página tal), se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney. En todas las gráficas fueron utilizadas las medianas de cada grupo de tratamiento.

5. RESULTADOS

Los resultados indican que la exposición a ozono genera alteraciones en la sustancia nigra de ratas expuestas a bajas dosis de ozono en los siguientes parámetros de estudio: las concentraciones de glutatión total, de glutatión reducido y glutatión oxidado; la enzima limitante para la formación del glutatión, la γ -glutamilcisteinil sintetasa; el factor de transcripción nuclear Nrf2; la actividad de las enzimas del sistema glutatión, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa; el marcador de estrés oxidativo, la 3-nitrotirosina; la enzima Trp-2 o dopacromo tautomerasa y la presencia de neuromelanina.

5.1. CANTIDAD DE GLUTATIÓN TOTAL EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

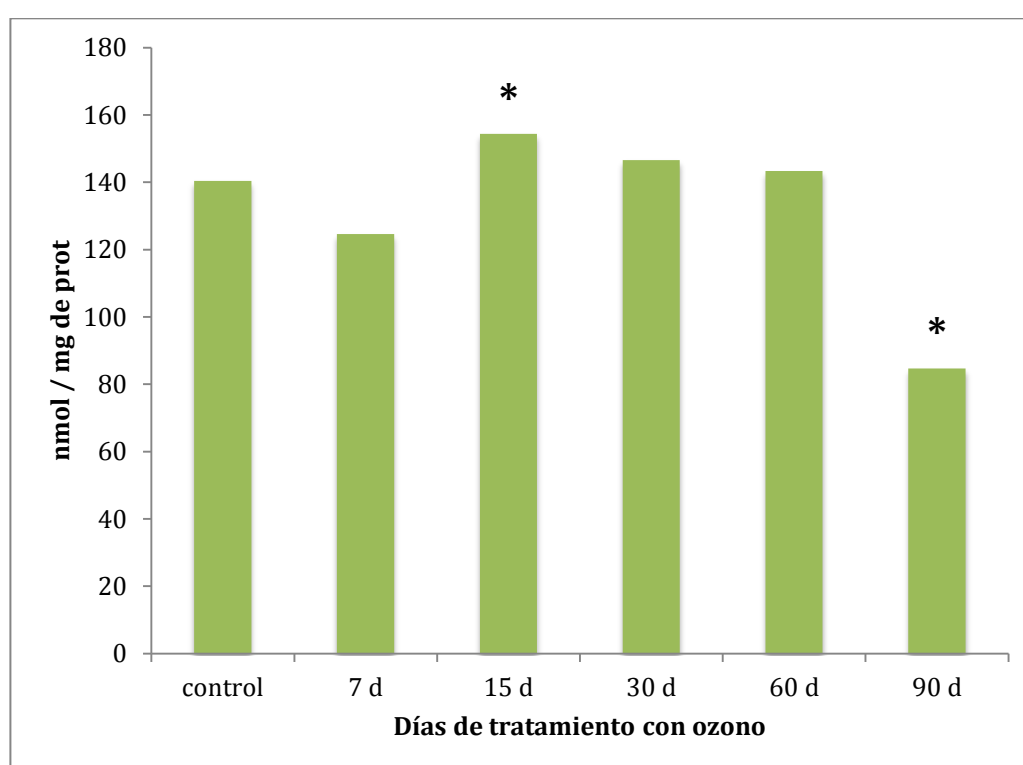


Figura 7. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la concentración del glutatión total en la sustancia nigra de ratas. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran los nmol por mg de proteína de glutatión total. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.001$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un incremento significativo en las concentraciones a los 15 d ($p \leq 0.010$) y una disminución significativa en el grupo de 90 d ($p \leq 0.004$) cuando son comparados con el grupo control. Además se observa que el grupo de 90 d de tratamiento es el que menor cantidad de GT presenta.

5.1.2. CANTIDAD DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

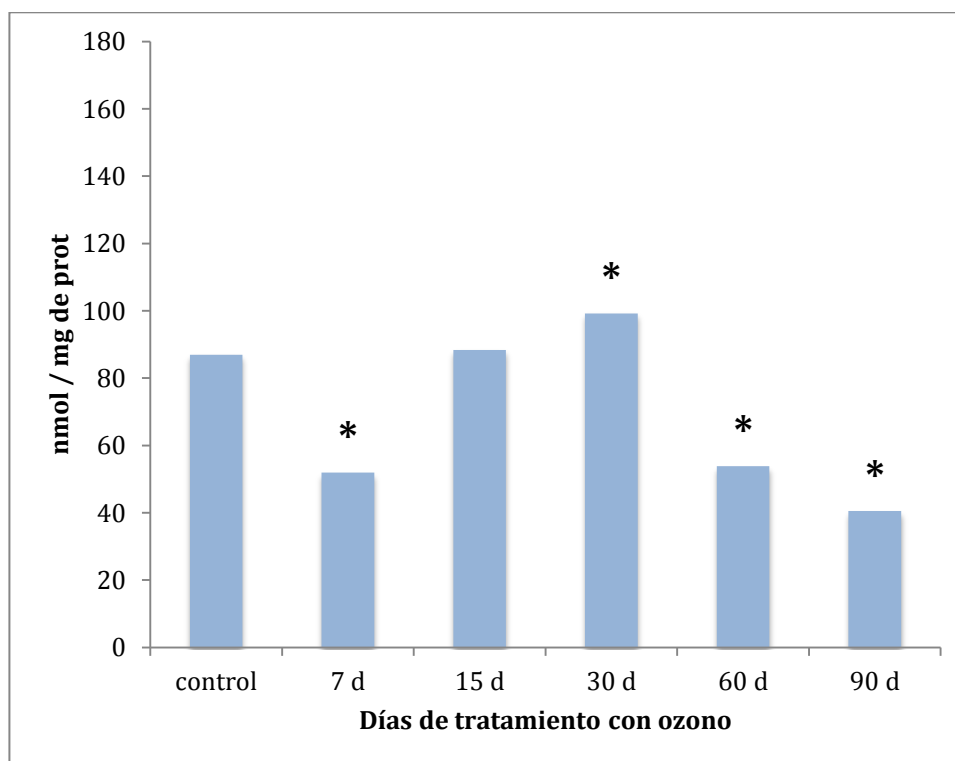


Figura 8. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la concentración del glutatión reducido en la sustancia nigra de ratas. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran los nmol por mg de proteína de glutatión total. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.000$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra una disminución significativa de las concentraciones a los 7 d de tratamiento ($p \leq 0.004$) y un aumento significativo a los 30 d ($p \leq 0.006$) seguido de una disminución a los 60 d y 90 d de tratamiento ($p \leq 0.004$ en ambos casos) cuando se comparan con el grupo control. Los resultados anteriores indican que las concentraciones de glutatión reducido disminuyen a los 7 días de tratamiento con ozono pero que aumentan para alcanzar un nivel máximo a los 30 d, los cuales disminuyen progresivamente a los 60 d y 90 d de tratamiento.

5.1.3. CANTIDAD DE GLUTATIÓN OXIDADO EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

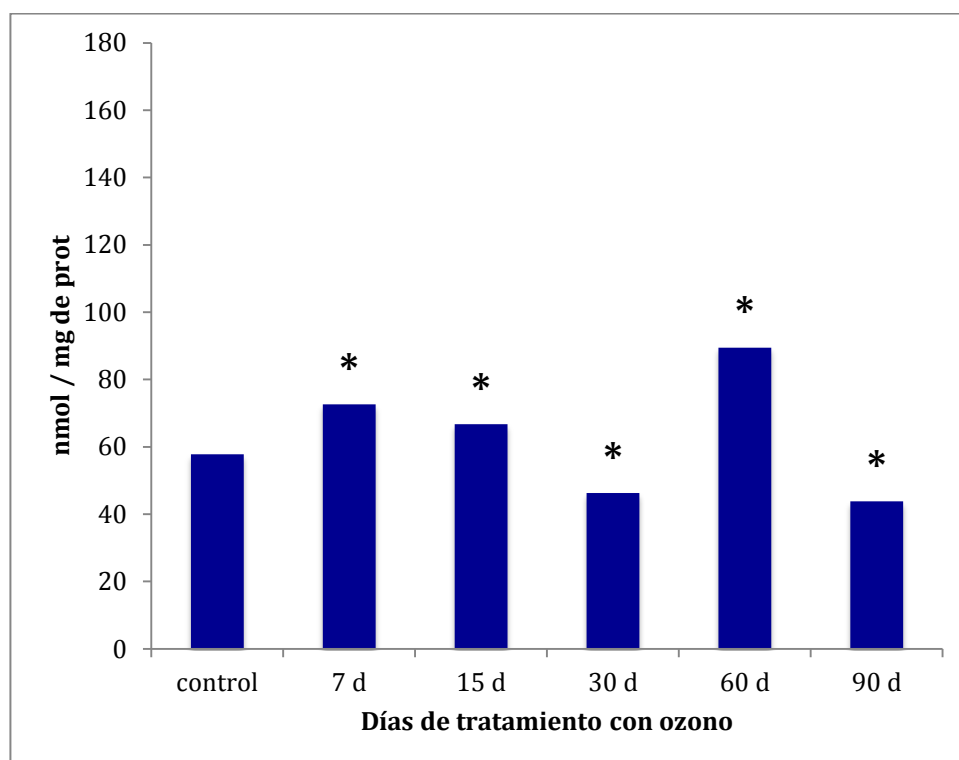


Figura 9. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la concentración del glutatión oxidado en la sustancia nigra de ratas. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran los nmol por mg de proteína de glutatión total. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.000$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestran diferencias significativas en todos los grupos respecto al grupo control. Se observa un aumento significativo en el grupo de 7 d ($p \leq 0.004$) y una disminución a los 30 d de tratamiento ($p \leq 0.004$). Finalmente se observa un aumento significativo a los 60 d ($p \leq 0.004$) y una disminución a los 90 d de exposición ($p \leq 0.004$) que se cuantifica como la menor de entre todos los grupos experimentales.

5.1.4. COMPARACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN REDUCIDO Y GLUTATIÓN OXIDADO (ÍNDICE GSSG/GSH) EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

La relación que guardan ambas especies de glutatión entre sí fueron calculadas mediante el índice GSSG/GSH

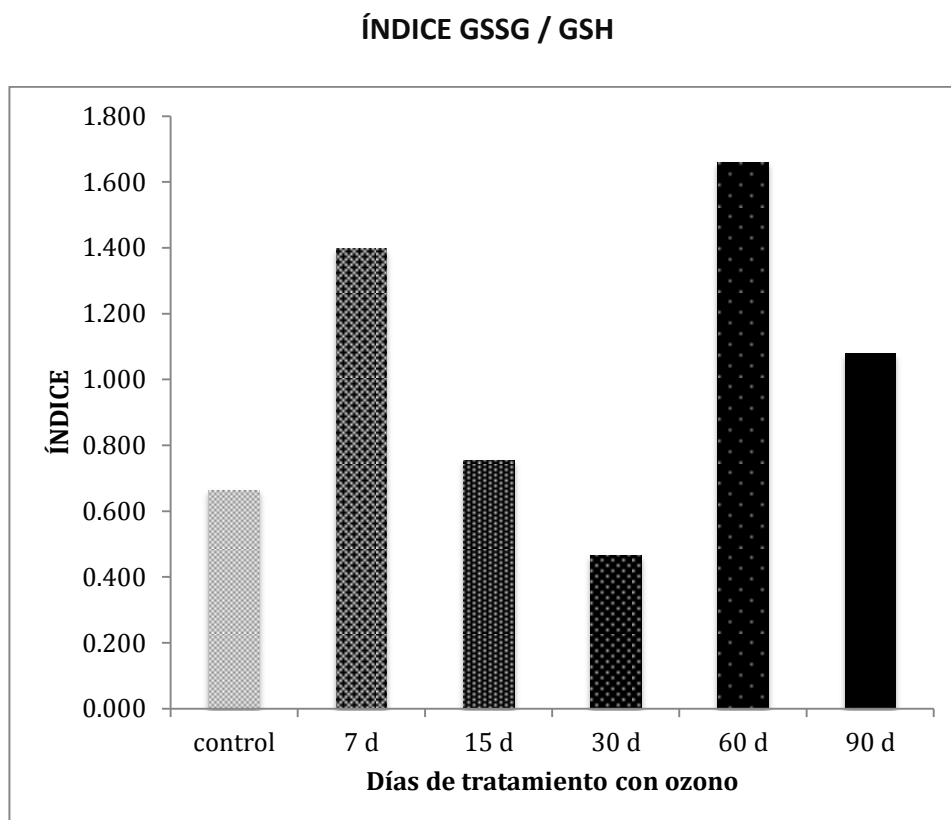


Figura 10. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono en la proporción GSSG/GSH. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se observan los valores del índice.

La relación GSSG/GSH indica que la mayor proporción de GSSG, se presenta a los 7 d y 60 d de tratamiento y la menor cantidad de oxidación se presenta a los 30 d de tratamiento con ozono.

5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA LA ENZIMA γ -GLUTAMILCISTEINIL SINTETASA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Para el análisis de la inmunohistoquímica contra esta enzima fueron tomadas cinco microfotografías de la sustancia nigra a 40x de aumento en cada corte de tejido de cada rata, se analizaron 3 ratas por cada grupo y se contaron las células inmunoreactivas a la enzima γ -glutamincisteinil sintetasa. Los resultados son los siguientes:

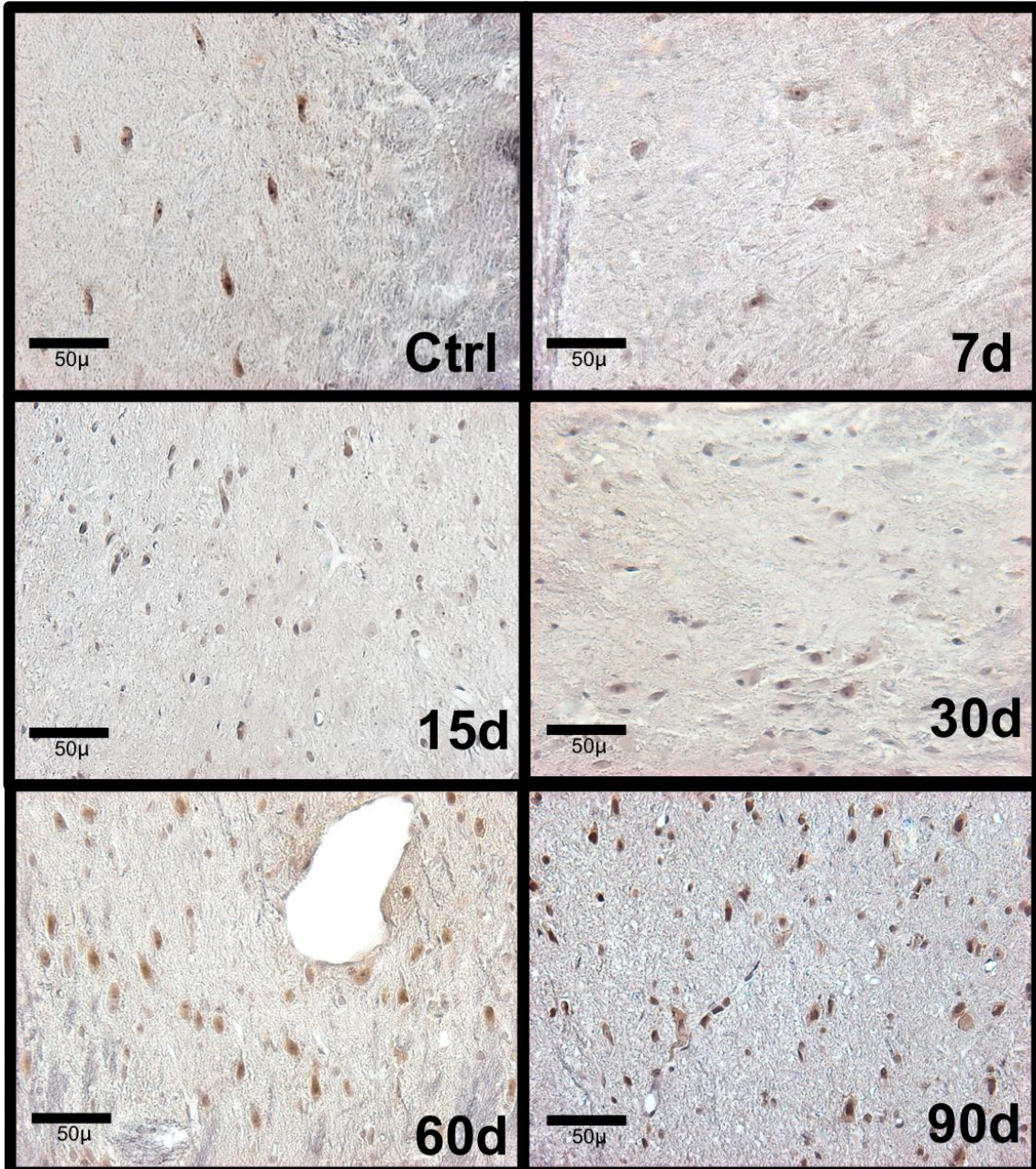


Figura 11. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunoreactividad a la enzima γ -glutamincisteinil sintetasa. Microfotografías a 40x en las que se muestran las imágenes representativas de cada grupo experimental y la marca positiva del anticuerpo en color café

Observe las escasas células positivas en el grupo control, 7 d , 15 d y el incremento de éstas a partir de los 30 d de tratamiento. Note el daño tisular (neurópilo con abundantes espacios) presente a los 90 d de tratamiento por efecto de la exposición a ozono.

5.3.1. NÚMERO DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS A LA ENZIMA γ -GLUTAMILCISTEINIL SINTETASA

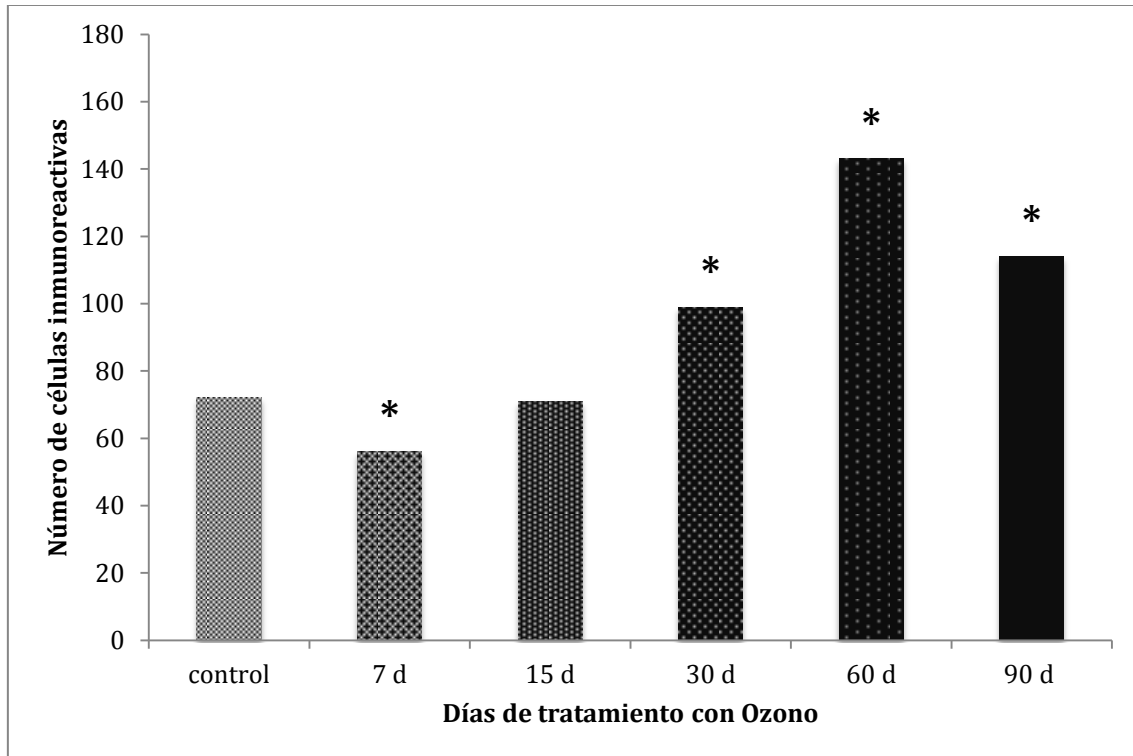


Figura 12. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas a la γ -glutamylcisteinil sintetasa. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de cada conteo celular. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.007$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra una disminución significativa de la inmunoreactividad a la γ -glutamylcisteinil sintetasa a los 7 d ($p \leq 0.046$) de tratamiento y un incremento a los 30 d ($p \leq 0.046$), 60 d ($p \leq 0.046$) y 90 d ($p \leq 0.046$) respecto al grupo control. Además se observa que a los 60 d de tratamiento se observan los mayores valores del conteo celular.

Para un análisis más profundo de cada microfotografía, se cuantificó mediante análisis digital en cada una, la frecuencia de píxeles correspondientes a la inmunoreactividad y se sumó el resultado de las cinco microfotografías para obtener la frecuencia total de píxeles por corte de tejido, después se calculó la mediana grupal. Los resultados se expresaron como la cantidad de píxeles positivos por grupo experimental.

5.3.2. DENSIDAD DE PÍXELES POSITIVOS A LA INMUNOREACTIVIDAD DE LA ENZIMA γ -GLUTAMILCISTEINIL SINTETASA

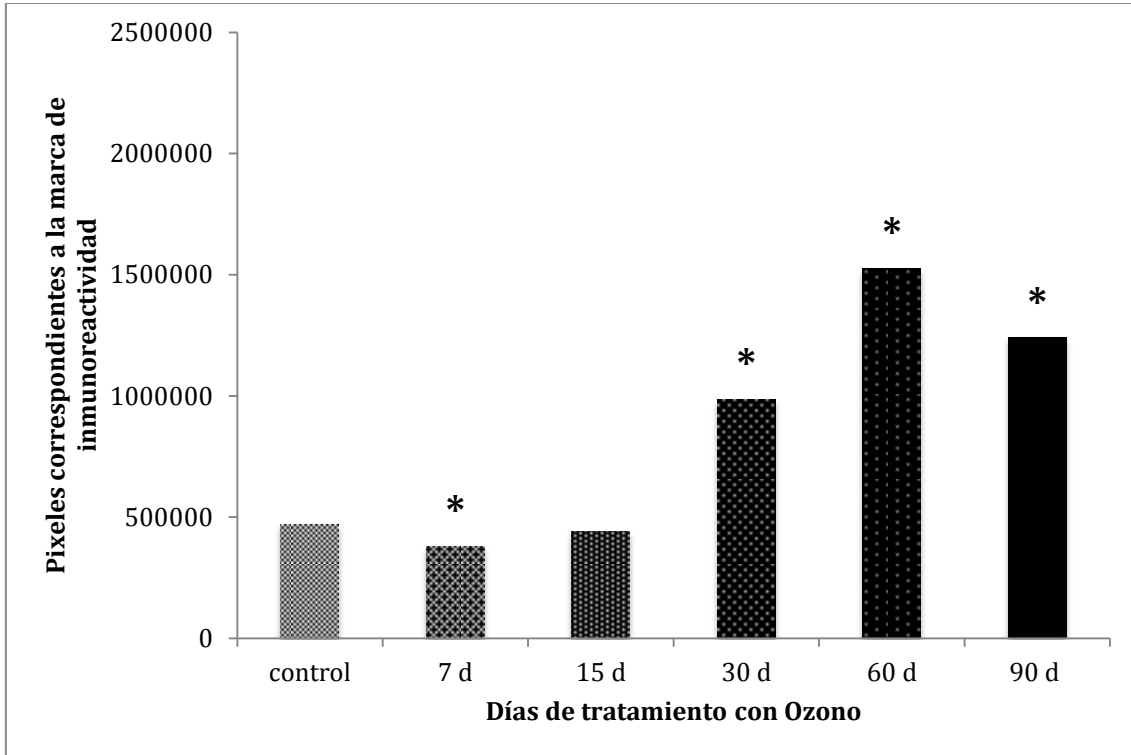


Figura 13. Densidad de píxeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de γ -glutamylcisteinil sintetasa. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de la frecuencia total de píxeles por 5 campos. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.006$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en todos los casos) que indican que la densidad de los píxeles correspondientes a la tinción de la γ -glutamylcisteinil sintetasa, muestran una proporción muy semejante a la mediana graficada para el conteo celular observándose una disminución significativa a los 7 d y un aumento significativo a los 30 d, 60 d y 90 d de tratamiento.

5.4. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA EL NRF2 EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Para el análisis de este factor de transcripción se analizó la inmunoreactividad en núcleos celulares, fueron tomadas cinco microfotografías de la sustancia nigra a 40x de aumento en cada corte de tejido de cada rata con n= 3 por grupo experimental y se contaron las células que presentaron inmunoreactividad contra el Nrf2 sólo en los núcleos.

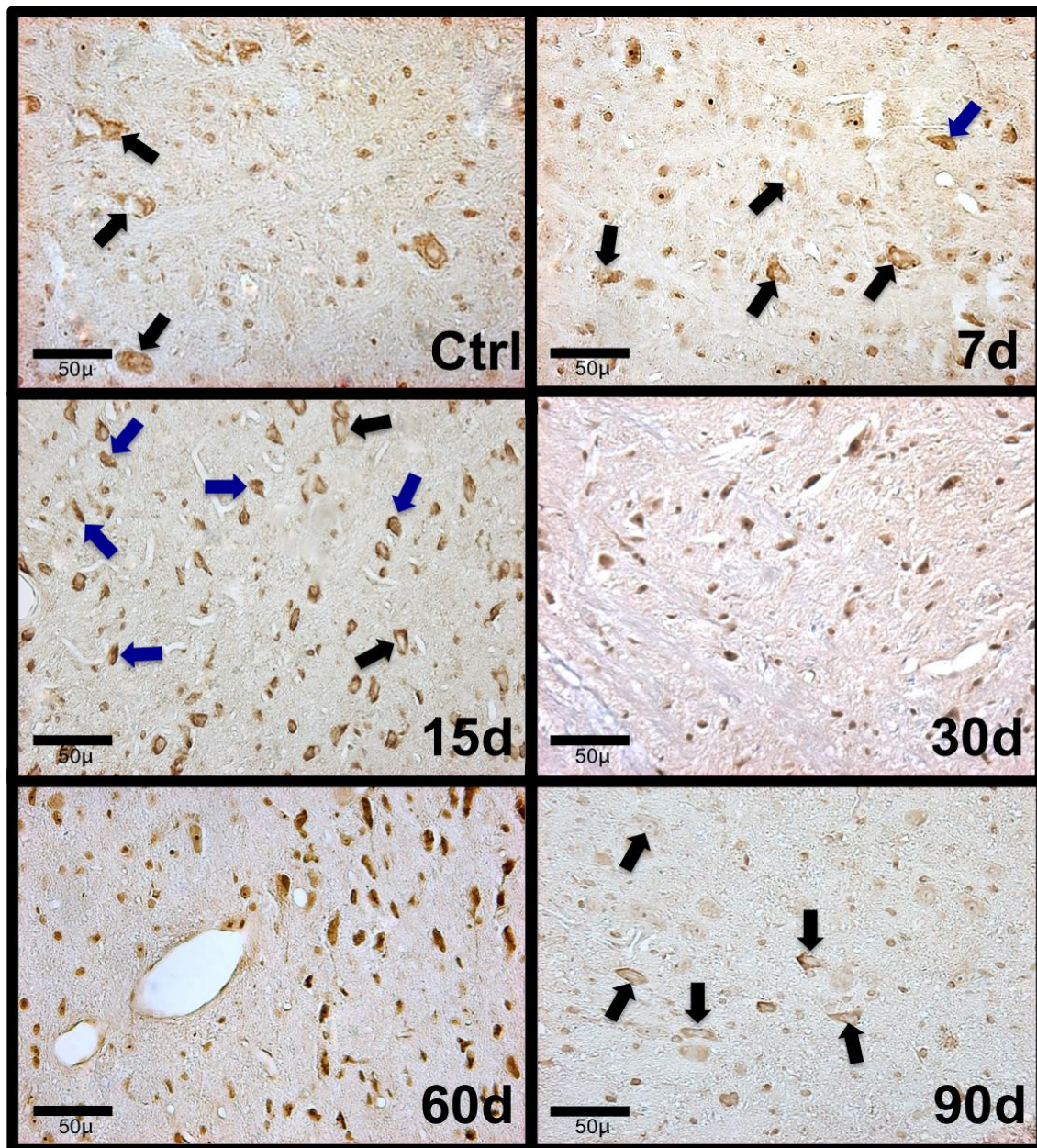


Figura 14. Inmunohistoquímica contra Nrf2 en sustancia nigra de ratas expuestas a ozono. Microfotografías a 40x en las que se muestran las imágenes representativas de cada grupo experimental y la marca positiva del anticuerpo en color café.

Observe que en los grupos control, 7 d y 15 d existen núcleos claramente pálidos (flechas negras). No obstante a los 7 d y 15 d comienza un incremento en los núcleos con marca positiva (flecha azul). Se observa un aumento en la cantidad de núcleos positivos en los grupos de 30 d y 60 d, con mayor aumento en éste último y por el contrario a los 90 d se observa una disminución evidente en la tinción de los mismos.

5.4.1. NÚMERO DE CÉLULAS CON NÚCLEOS POSITIVOS A LA INMUNOREACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2

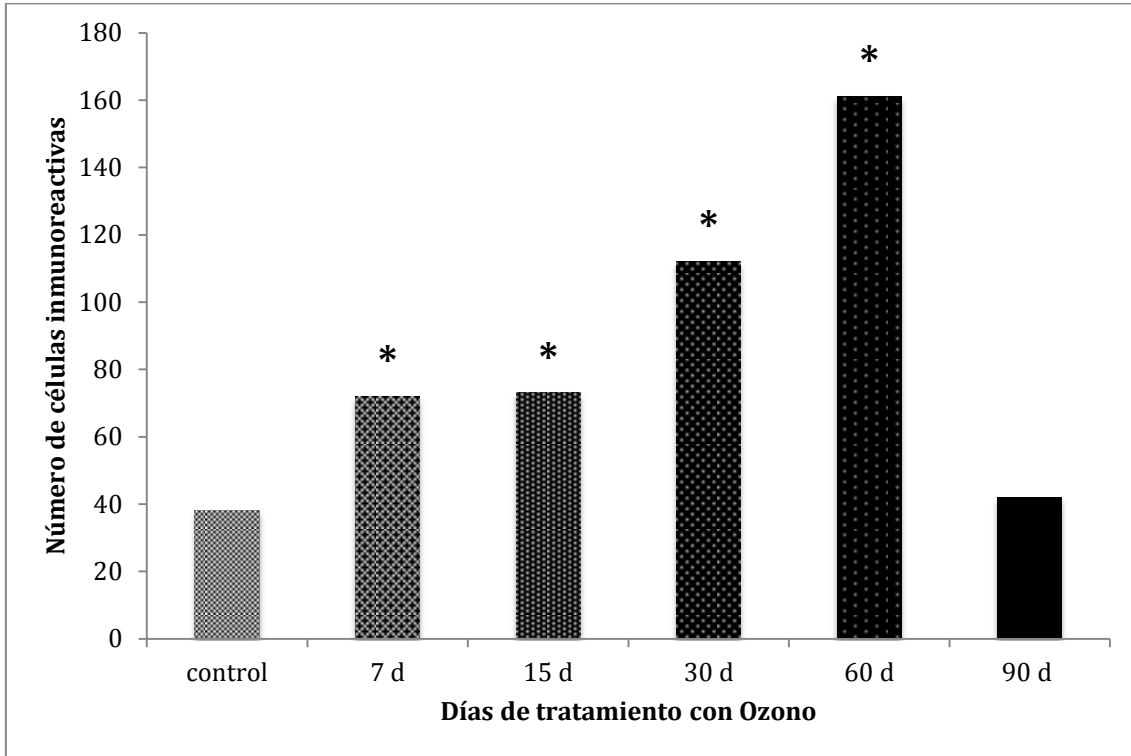


Figura 15. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas al Nrf2. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de cada conteo nuclear, el asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Se puede observar que el tratamiento con ozono es capaz de inducir la translocación al núcleo del Nrf2 entre los grupos experimentales. Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.007$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un incremento significativo a los 7 d ($p \leq 0.046$), 15 días ($p \leq 0.05$), 30 días ($p \leq 0.05$), 60 días ($p \leq 0.05$) con respecto al control

5.4.2. DENSIDAD DE PÍXELES POSITIVOS A LA INMUNOREACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2

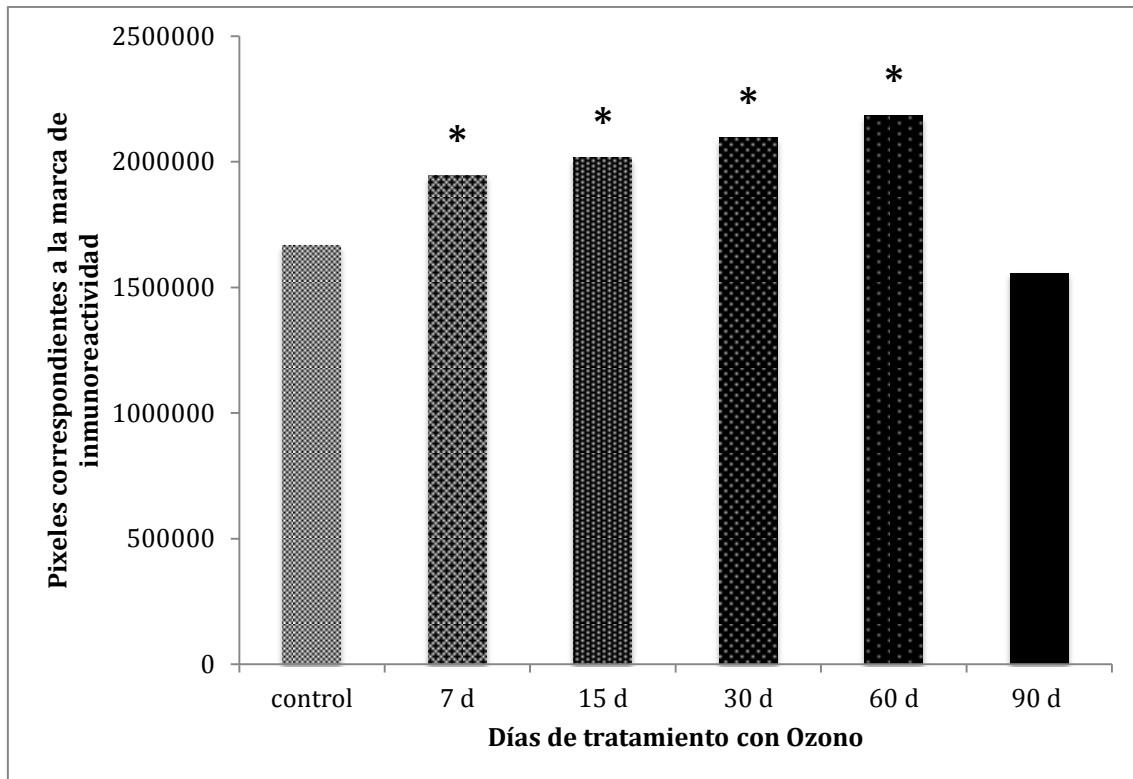


Figura 16. Densidad de píxeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de Nrf2. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de la frecuencia total de píxeles por 5 campos. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

En estos resultados se muestran los cambios en la inmunoreactividad del Nrf2 y su presencia tanto en citoplasma como en núcleo. Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.006$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un incremento significativo ($p \leq 0.05$ en todos los casos) cuando se comparan los grupos de 7 d, 15 d, 30 d y 60 d de tratamiento contra el grupo control.

5.5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Los resultados muestran cambios en la actividad antioxidante de la GPx por efecto de la exposición a ozono.

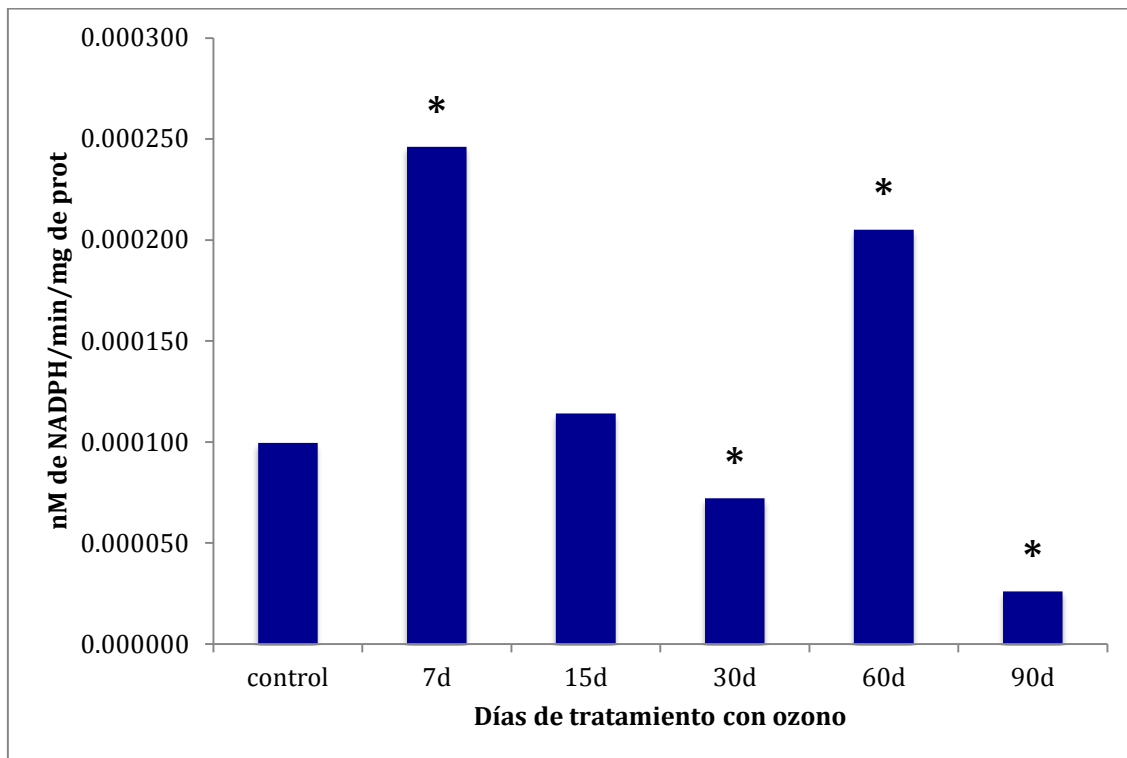


Figura 17. El efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la actividad de la enzima Glutathión peroxidasa. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestra la actividad de la enzima en nM de NADPH por minuto por mg de proteína de tejido. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.000$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un aumento significativo en la actividad de la Gpx a los 7 d ($p \leq 0.004$), una disminución significativa a los 30 d ($p \leq 0.025$), un aumento significativo a los 60 d ($p \leq 0.006$) y una disminución significativa a los 90 d de tratamiento ($p \leq 0.004$) cuando se comparan los grupos experimentales con el grupo control. Se puede observar con claridad que los grupos en los que mayor actividad se cuantifica son 7 d y 15 d de tratamiento a ozono.

5.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN REDUCTASA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Los resultados de la cuantificación de la actividad de la Gr, muestran alteraciones de la actividad reductora de esta enzima por efecto de la exposición a ozono.

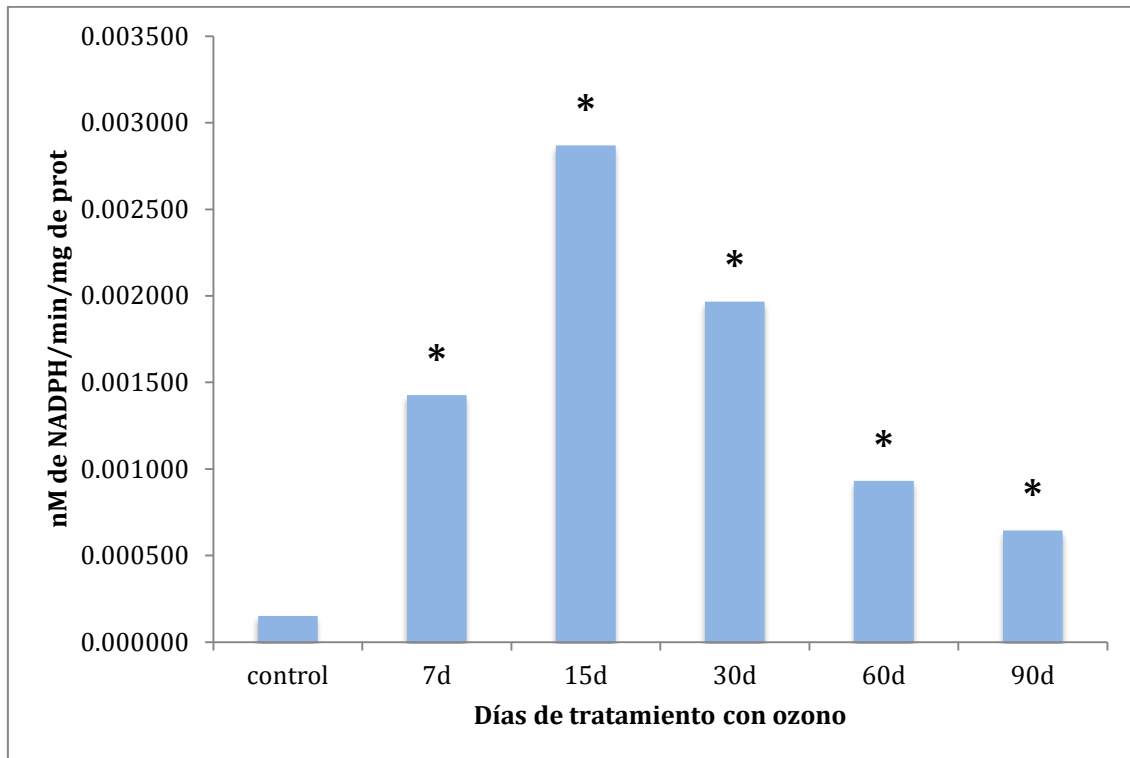


Figura 18. El efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la actividad de la enzima Glutathión reductasa. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestra la actividad de la enzima en nM de NADPH por minuto por mg de proteína de tejido (los resultados son las medianas grupales). El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.000$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un aumento significativo ($p \leq 0.05$) a los 7 d , 15 d , 30 d , 60 d y 90 d de exposición en todos los casos comparados con el grupo control. Lo anterior indica que la exposición a ozono aumenta la actividad de la Gr en todos los grupos cuando se comparan con el grupo control, con un máximo a los 15 d y un mínimo a los 90 d de tratamiento.

5.7. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA 3 NITROTIROSINA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Para el análisis de inmunohistoquímica contra este marcador de estrés oxidativo, fueron tomadas cinco microfotografías de la sustancia nigra a 40x de aumento de cada corte de tejido por rata, se analizaron 3 ratas por grupo y se contaron las células inmunoreactivas a la 3-NT. Los resultados son los siguientes:

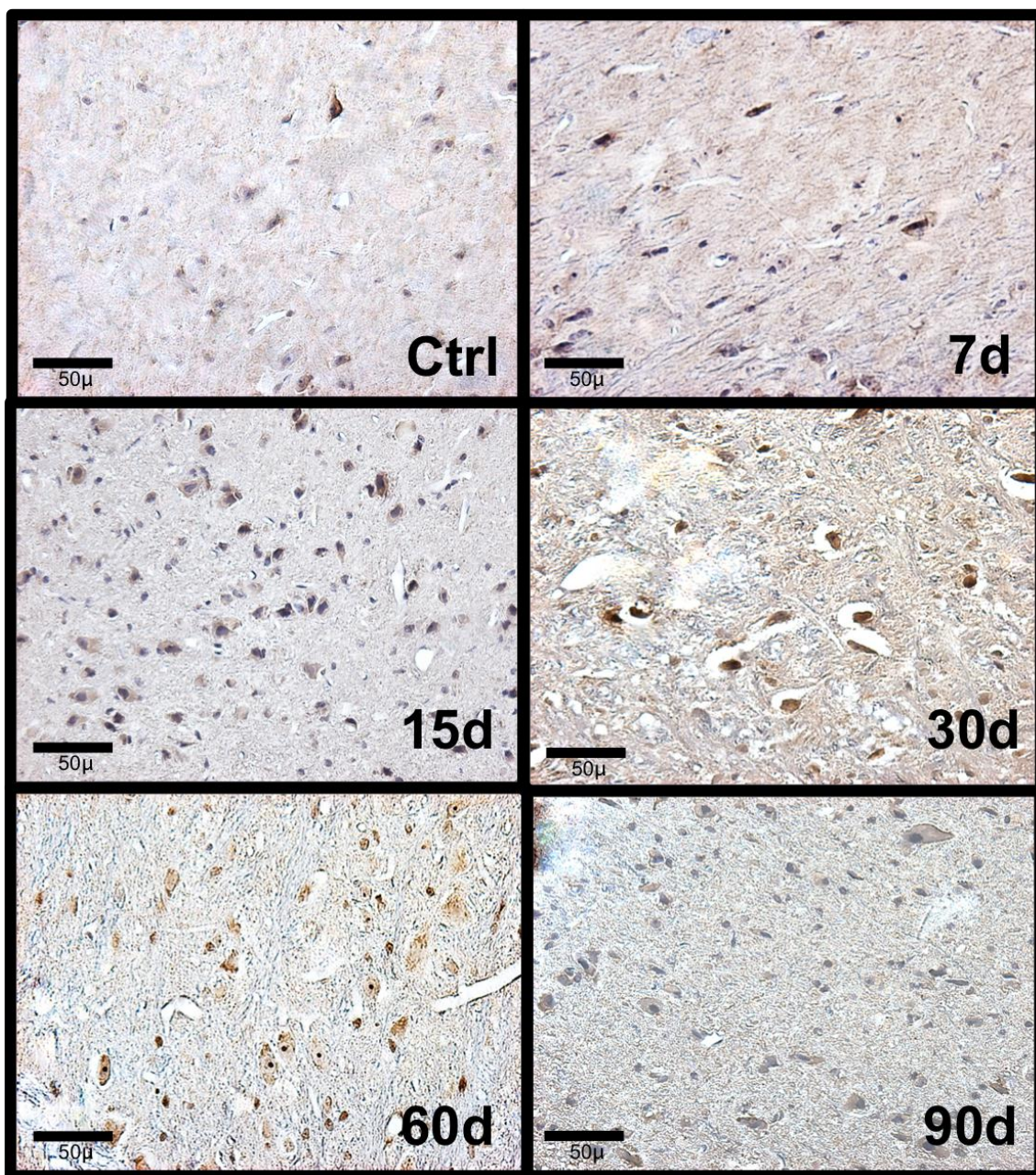


Figura 19. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunoreactividad al 3-NT. Microfotografías a 40x en las que se muestran las imágenes representativas de cada grupo experimental y la marca positiva del anticuerpo en color café.

Observe el aumento de células positivas desde los 7 d hasta los 60 d de tratamiento, siendo éste último grupo el que mayor inmunoreactividad presenta.

5.7.1. NÚMERO DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS A 3-NT

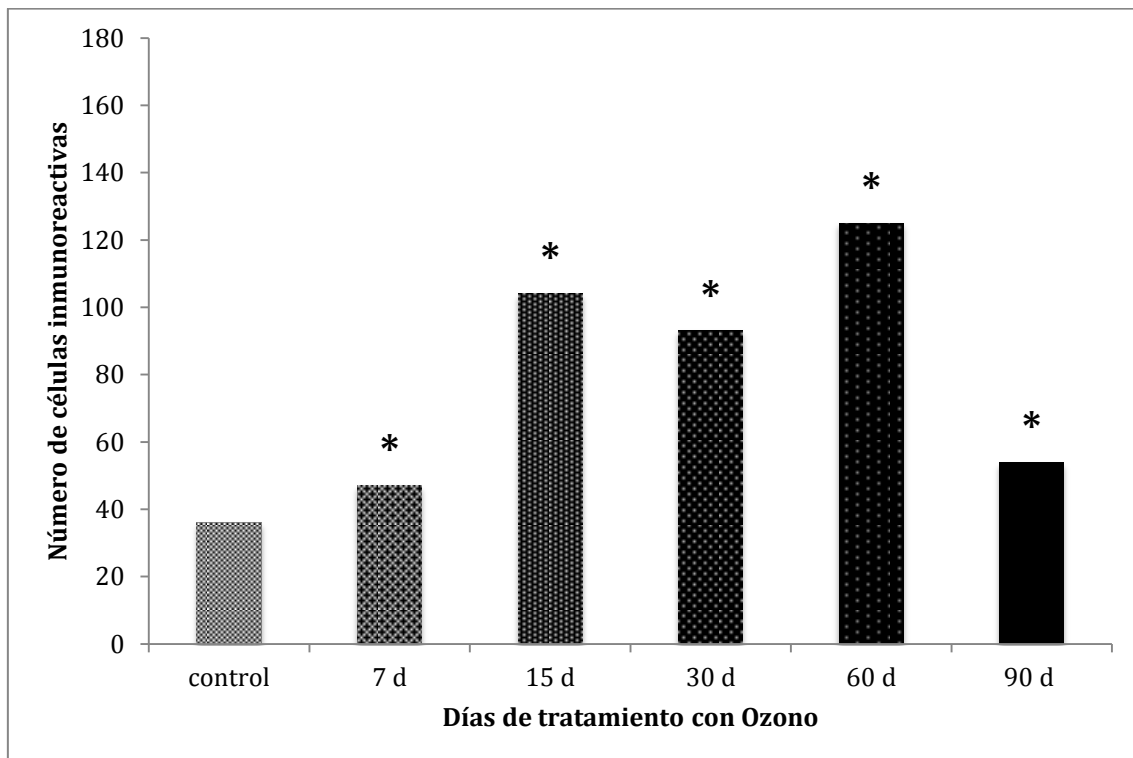


Figura 20. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas a 3-NT. En el eje de las abscisas se muestran los tratamientos de los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de cada conteo celular. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.007$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un aumento significativo del marcador de estrés oxidativo a los 7 d ($p \leq 0.05$), 15 d ($p \leq 0.05$), 30 d ($p \leq 0.046$), 60 ($p \leq 0.05$) y 90 d ($p \leq 0.05$) de exposición a ozono, cuando se comparan con el grupo control.

5.7.2. DENSIDAD DE PÍXELES POSITIVOS A LA INMUNOREACTIVIDAD A LA 3-NT

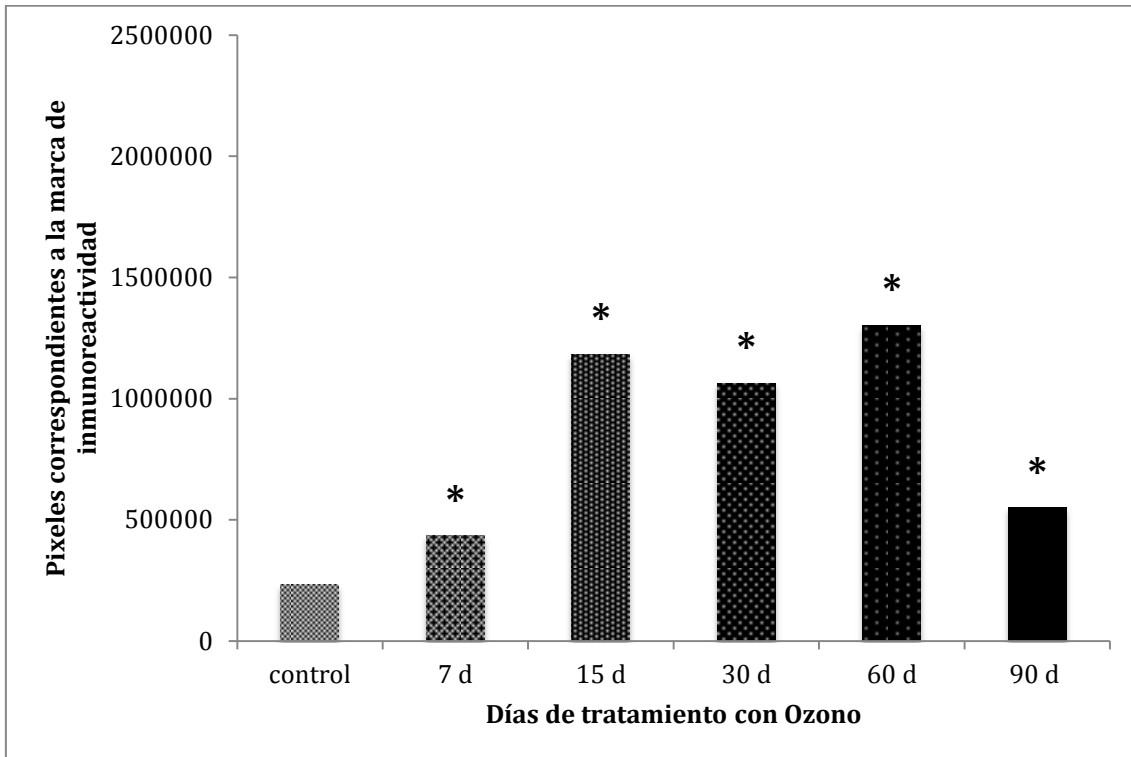


Figura 21. Densidad de píxeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de 3-NT. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de la frecuencia total de píxeles por 5 campos. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.006$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en todos los grupos cuando son comparados con el grupo control..

5.8. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA LA ENZIMA PROTEÍNA 2 RELACIONADA CON LA TIROSINASA O DOPACROMO TAUTOMERASA (TRP-2) EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Para el análisis de la inmunohistoquímica contra esta enzima fueron tomadas cinco microfotografías de la sustancia nigra a 40x de aumento en cada corte de tejido de cada rata, se analizaron 3 ratas por grupo y se contaron las células inmunoreactivas a la enzima Trp-2. Los resultados son los siguientes:

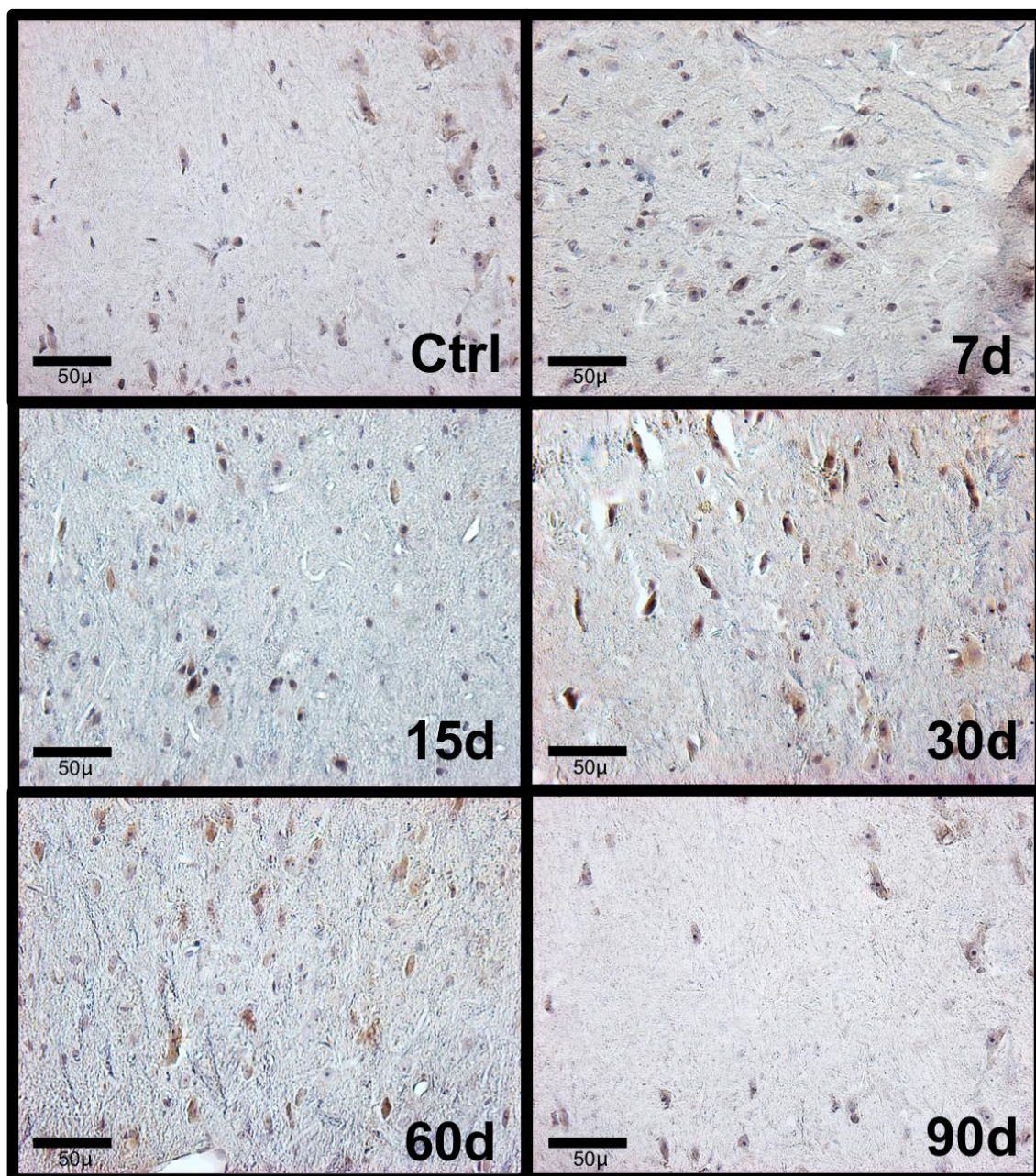


Figura 22. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunoreactividad a la Trp-2. Microfotografías a 40x en las que se muestran las imágenes representativas de cada grupo experimental y la marca positiva del anticuerpo en color café.

Observe que desde los 7 d hasta los 60 d de tratamiento ocurre un aumento en la inmunoreactividad a la Trp-2 y una disminución a los 90 d de tratamiento.

5.8.1. NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS A LA INMUNOREACTIVIDAD DE LA ENZIMA TRP-2

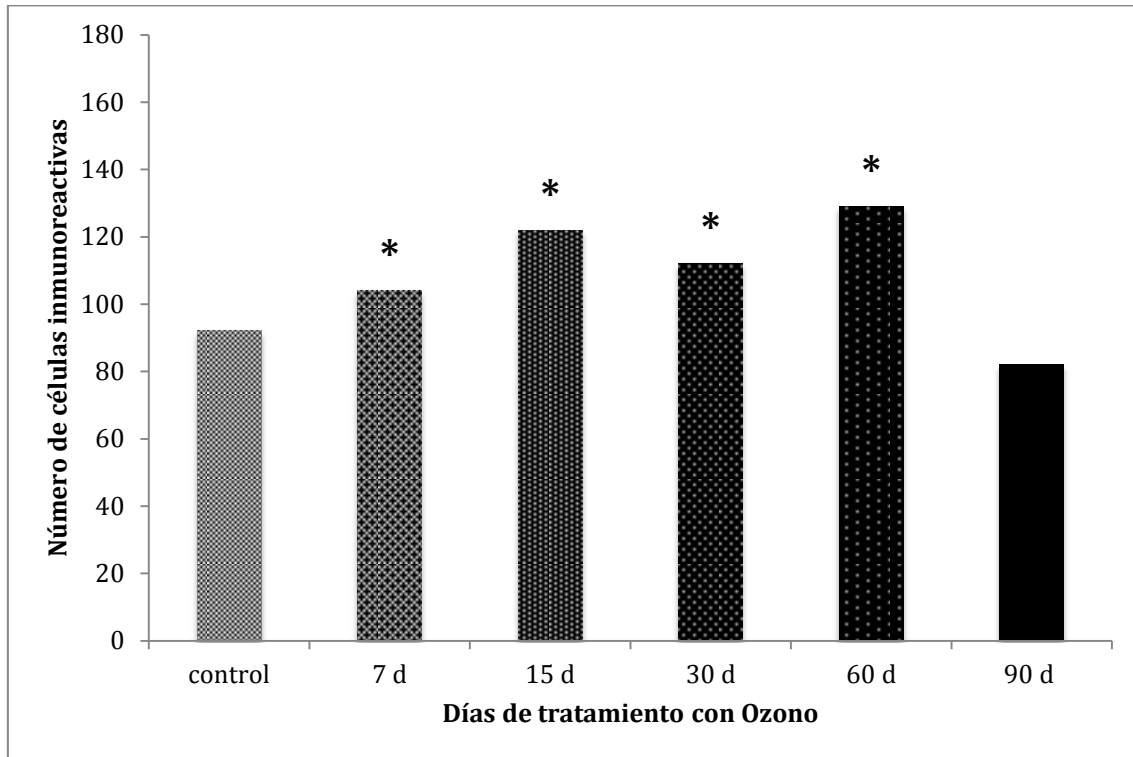


Figura 23. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células inmunoreactivas a la enzima Trp-2. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de cada conteo celular. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.018$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un incremento significativo ($p < 0.046$ en todos los casos) a los 7 d, 15 d, 30 d, 60 d de exposición a ozono comparados con el grupo control, pero no así en el grupo de 90 d de tratamiento donde no existe diferencia significativa respecto al control.

5.8.2. DENSIDAD DE PÍXELES POSITIVOS A LA INMUNOREACTIVIDAD DE LA ENZIMA TRP-2

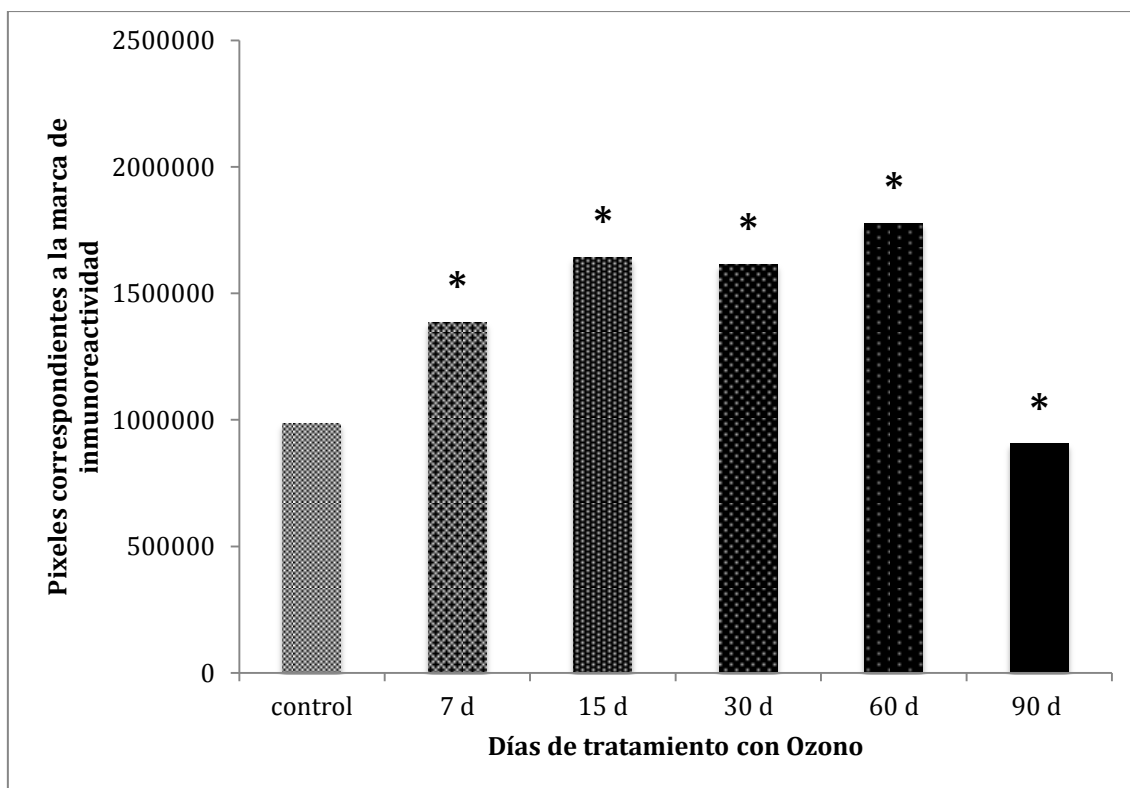


Figura 24. Densidad de píxeles positivos en cinco microfotografías de la inmunoreactividad de Trp-2. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de la frecuencia total de píxeles por 5 campos. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.006$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un aumento significativo ($p \leq 0.05$ en todos los casos) desde los 7 d hasta los 60 d y una disminución a significativa a los 90 d de tratamiento ($p \leq 0.05$) al compararse con el grupo control. Estos resultados también muestran que la menor densidad de píxeles se observa en el grupo de 90 d de tratamiento.

5.9. HISTOQUÍMICA PARA LA TINCIÓN DE NEUROMELANINA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

Para el análisis de la tinción de neuromelanina de la sustancia nigra de ratas, fueron tomadas cinco microfotografías de la sustancia nigra a 40x de aumento en cada corte de tejido de cada rata, se analizaron 3 ratas y se contaron las células positivas a la reacción argéntica. Los resultados son los siguientes:

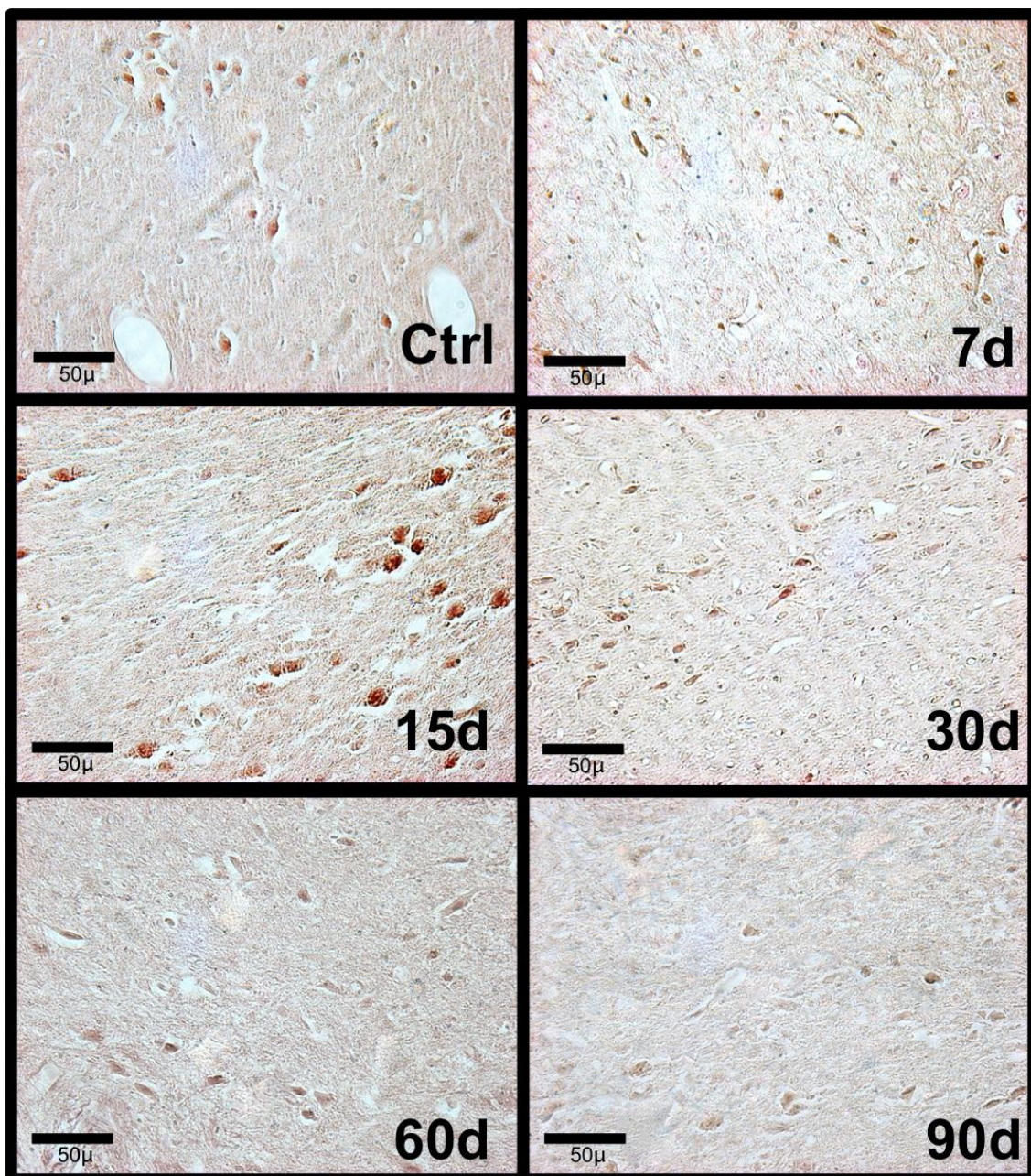


Figura 25. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la tinción de neuromelanina. Microfotografías a 40x en las que se muestran las imágenes representativas de cada grupo experimental y la marca positiva en color marrón oscuro.

Observe la presencia de neuromelanina en mayor proporción desde los 7 d de tratamiento y la disminución evidente a los 60 d y 90 d de tratamiento.

5.9.1. NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS A LA TINCIÓN ARGÉNTICA PARA NEUROMELANINA

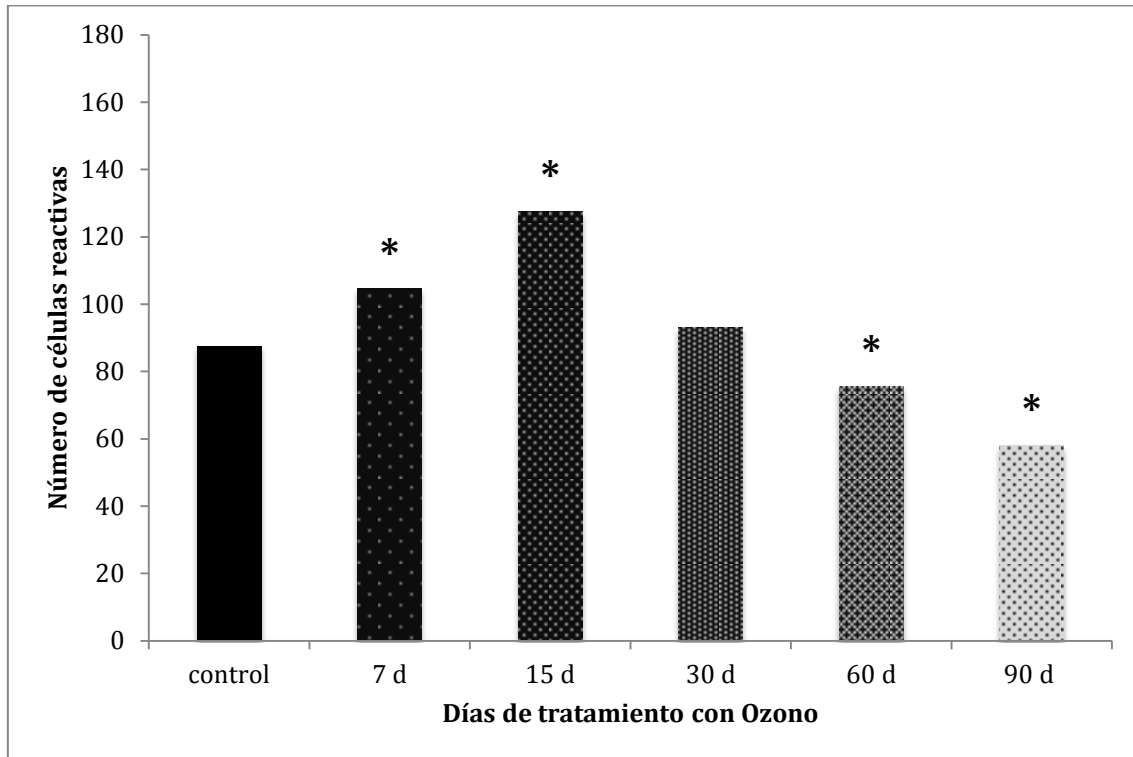


Figura 26. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre el número de células positivas a la tinción de neuromelanina. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de cada conteo celular. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al grupo control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.001$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra un aumento significativo en el conteo celular a los 7 d y 15 d ($p \leq 0.021$ en ambos casos) y una disminución en la cantidad de células positivas a neuromelanina a los 60 d ($p \leq 0.029$) y 90 d ($p \leq 0.021$) de tratamiento con ozono con respecto al control. Con esto se observa que el grupo de 90 d de tratamiento muestra los valores más bajos para la tinción de neuromelanina.

5.9.2. DENSIDAD DE PÍXELES POSITIVOS DE LA TINCIÓN DE LA TÉCNICA ARGÉNTICA PARA NEUROMELANINA

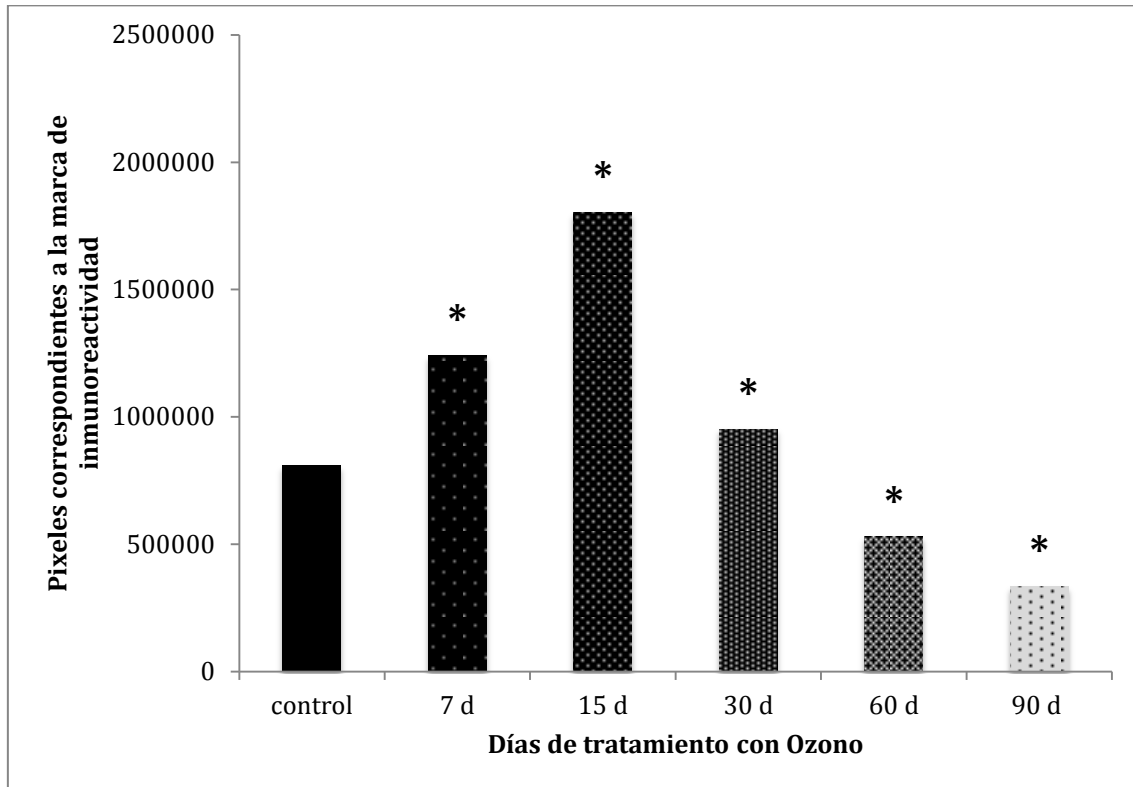


Figura 27. Densidad de píxeles positivos en cinco microfotografías de la tinción de neuromelanina. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales y en el eje de las ordenadas se muestran las medianas de la frecuencia total de píxeles por 5 campos. El asterisco marca las diferencias significativas respecto al control.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.000$). Con la prueba de U de Mann Whitney se muestra que la densidad de los píxeles correspondientes a la tinción de neuromelanina, muestran un aumento significativo a los 7 d, 15 d y 30 d de tratamiento ($p < 0.05$ en cada caso) comparados con el grupo control. Sin embargo se observa una disminución significativa ($p \leq 0.021$ en cada caso) a los 30 d, 60 d y 90 d de tratamiento al compararse con el grupo control. De forma que se observa con claridad que a los 90 d de tratamiento se presenta la menor densidad de píxeles correspondientes a la tinción de neuromelanina.

6. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que las alteraciones que se presentaron en el sistema de defensa antioxidante y en el de formación de neuromelanina, fueron consecuencia de la exposición a bajas dosis de ozono y estas alteraciones pueden estar relacionadas entre sí.

6.1. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE. SÍNTESIS DE GLUTATIÓN, SISTEMA GLUTATIÓN Y NRF2

Se observa que los cambios que le ocurren a la síntesis de glutatión así como los que ocurren en el sistema glutatión se pueden analizar en dos etapas. La primera (antes de los 30 d de tratamiento) en la cual el sistema de defensa produce una respuesta eficiente ante el aumento de las especies reactivas y puede controlar el daño oxidativo. Y la segunda (más allá de los 30 d de tratamiento) en la cual el sistema de defensa mantiene una respuesta, pero ésta no logra prevenir el daño oxidativo. Llamaremos a la primera, etapa de compensación y a la segunda la llamaremos etapa de descompensación.

Los niveles de glutatión total presentan únicamente dos variaciones significativas, un incremento a los 15 d y una disminución a los 90 d de tratamiento. La explicación a estos dos fenómenos está relacionada con los resultados que se obtuvieron en el estudio de la expresión de la γ -glutamylcysteinil sintetasa; el aumento del glutatión total puede deberse a un incremento en la expresión de la enzima que lo sintetiza, la γ -glutamylcysteinil sintetasa, sin embargo a los 15 d de tratamiento no existe un incremento de la síntesis de esta enzima, por lo tanto el aumento puede estar originado por una mayor disponibilidad de dos de precursores del glutatión y así su síntesis de novo verse potenciada (Martínez , 2006) en otras palabras, el glutamato y la cisteína, podrían encontrarse en mayor disponibilidad y así mejorar la catálisis enzimática de la γ -glutamylcysteinil sintetasa (etapa de compensación). Sin embargo a partir de los 30 d de exposición a ozono, la expresión de la γ -glutamylcysteinil sintetasa se incrementa significativamente con valores máximos a los 60 d de tratamiento sin una correlación con las concentraciones de GT que de hecho muestran los valores más bajos a los 90 d de tratamiento. Lo anterior sugiere que más allá de los 30 d de exposición se presenta una respuesta ineficiente del sistema para la síntesis de novo de glutatión, en donde la γ -glutamylcysteinil sintetasa, incrementa su expresión pero es incapaz de formar glutatión probablemente porque la disponibilidad de los precursores está disminuida importantemente. Uno de los componentes que limitan el ensamblaje del glutatión es la cisteína. Éste aminoácido reacciona ante la presencia de metabolitos oxidados de la dopamina (los cuales aumentan cuando se incrementa el ambiente oxidativo) y se combina con ellos para formar especies químicas que limitan su disponibilidad (Fornstedt et al., 1986, Li and Dryhurst, 1997; Méndez, 2004; Shen et al., 1997; Tse et al., 1976) De esta forma la γ -glutamylcysteinil sintetasa se encuentra ante una falta de sustrato sobre el cual actuar. Aún más, es posible que las concentraciones de glutatión total no se incrementen junto al aumento significativo de la γ -glutamylcysteinil sintetasa por un segundo fenómeno agregado: un secuestro de glutatión por interacción con los metabolitos oxidados de la dopamina, es decir la formación de especies como la 5-S-glutathionil-dopamina que eventualmente originará a la 5-S-cisteinil-dopamina

(Fornstedt et al., 1986; Prota 1988, Spencer et al., 2002; Tse et al., 1976). Con lo anterior se observan los mecanismos por los cuales sobreviene la incapacidad de la γ -glutamylcysteinyl synthetase para elevar las concentraciones de glutatión total en la etapa de descompensación.

Además de estas alteraciones en la cantidad de glutatión total, también se presentan cambios en las concentraciones de sus formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG). Sin embargo la proporción de ambas depende de la actividad de las enzimas del sistema glutatión, la Gr y la GPx que también presentan modificaciones. A los 7 d de tratamiento con ozono, se presenta un incremento significativo de la actividad de la GPx que se refleja en un aumento de la cantidad de GSSG, pero que no es proporcional al incremento de la actividad de la enzima, esto se explica porque la Gr, enzima encargada de reducirlo, también presenta un incremento significativo de la actividad y puede controlar la producción de GSSG, aunque éste logra permanecer por encima de las concentraciones del GSH. Esto indica que la GPx mantiene una tasa de producción de GSSG mayor que la tasa de reducción de la Gr, quizás esto se deba a que ambas enzimas requieren de selenio para su función y la disponibilidad de este metal impacta en la catálisis de ambas (Lauretani et al., 2007). De esta forma es posible que si una de las dos aumenta su actividad, limite la disponibilidad del selenio para la otra. Por eso en esta etapa de compensación podemos observar a los 15 d de tratamiento, al mayor incremento de la actividad de la Gr con una disminución de la actividad de la GPx, sin embargo ésta logra mantener valores semejantes a los del grupo control, y de igual forma las concentraciones de GSH y GSSG son semejantes a los valores del grupo control. Con esto se observa que el desequilibrio de la actividad de la GPx aún puede ser compensado y el sistema logra mantener niveles fisiológicos. Por el contrario en la etapa de descompensación, a los 30 d de tratamiento, observamos que la actividad de la Gr presenta un incremento de la actividad incluso menor que el de los 15 d de tratamiento y se acompaña de una disminución significativa de la actividad de la GPx que la lleva por debajo de los valores fisiológicos observados en el grupo control. Esto significa que el sistema ya no puede compensar el desequilibrio y la GPx pierde actividad, además de que la relación entre las especies de glutatión se muestra con un incremento del GSH sobre el GSSG. Esto sugiere que el GSH al no ser utilizado como agente reductor por la GPx, no pasa a su forma oxidada y no confiere protección ante el daño oxidativo. En esta etapa el desequilibrio de las reacciones de óxido-reducción, induce un intento de respuesta de defensa a los 60 d de tratamiento por parte de la GPx, misma que eleva las concentraciones de GSSG importantemente pero al mismo tiempo limitando la disponibilidad al selenio (Lauretani et al., 2007) y con ello impidiendo a la contraparte reductora de la Gr que no puede corresponder al aumento de GSSG y muestra una incapacidad para restituir los valores de GSH. Con todo lo anterior podemos observar que el efecto de la exposición a ozono genera en el sistema glutatión un desequilibrio tal que lleva a una respuesta ineficaz de defensa contra la creciente formación de especies reactivas y se observa de forma evidente la pérdida de la eficacia a los 90 d de tratamiento, donde las concentraciones de GSH, de GSSG y la actividad de ambas enzimas muestran valores muy por debajo de los fisiológicos observados en el grupo control.

Adicionalmente es de esperarse que el efecto protector del sistema glutatión, en particular el de la GPx, se vea relacione con los valores del marcador de estrés oxidativo, la 3-NT. Se puede observar que a los 60 d de tratamiento se encuentra un

gran daño oxidativo reflejado por el incremento en los valores de la 3-NT, que además de ser los más elevados ocurren a pesar del aumento de la actividad de la GPx. Esto es una evidencia de que en la etapa de descompensación ocurre una incapacidad de la GPx para prevenir el daño, una falta de eficacia de la Gr para restaurar las concentraciones de GSH y una imposibilidad del sistema para controlar los valores crecientes del marcador de estrés oxidativo.

Finalmente en cuanto al sistema de defensa antioxidante una regulación indispensable en el control del glutatión es el Nrf2, ya que es un inductor de la síntesis de la enzima γ -glutamilcisteinil sintetasa (Lee and Johnson, 2004) que se encarga del paso limitante para la formación del glutatión. Se observa que el incremento de la expresión de Nrf2 se acompaña también del aumento de la γ -glutamilcisteinil sintetasa, sin embargo a los 90 d de tratamiento se presenta una disminución significativa en cuanto a la translocación al núcleo, que no se acompaña de un descenso proporcional de la expresión de la γ -glutamilcisteinil sintetasa. Lo anterior significa que es probable que no exista una participación única del Nrf2 en la inducción de la expresión de la γ -glutamilcisteinil sintetasa y que otros mecanismos están involucrados en su expresión. Por ejemplo, en estudios sobre el orden de la secuencia de consenso de los ARE (PuTGAPirNNGCR, en donde Pu son purinas, Pir son pirimidinas y N es cualquier aminoácido)(Rushmore et al., 1991) se ha observado que existe un patrón de conservación entre los distintos genes que codifican para enzimas detoxificantes y antioxidantes (Klaassen and Reisman, 2010) como la γ -glutamilcisteinil sintetasa (Moinova and Mulcahy, 1998). Es posible que esta secuencia conservada ARE sea activada por otras vías distintas a la del Nrf2, si estos activadores poseen una estructura definida, como la de los compuestos electrófilos, ejemplos son hidroperóxidos, quinonas y metales pesados (Prester et al., 1993, Moinova and Mulcahy, 1998, Dinkova-Kostova et al., 2001, Nguyen et al., 2003) que sabemos se encuentran en los tejidos de 90 d de tratamiento por efecto de la exposición a ozono. Con base en lo anterior sugerimos que probablemente sean los compuestos electrófilos los responsables de mantener en cierto grado la expresión de los genes conservados ARE de la γ -glutamilcisteinil sintetasa cuando el Nrf2 ha dejado de translocar al núcleo. Pero la pérdida de la translocación al núcleo puede deberse a las alteraciones en los mecanismos de migración del Nrf2 al núcleo. En experimentos se ha comprobado que cuando se generan alteraciones en las señales de localización nuclear (NLS) se puede impedir la translocación del Nrf2 al núcleo. Han sido descritas moléculas que se involucran en este fenómeno como las importinas alfa 5 y beta 1 (Theodore et al., 2008). Sugerimos que el sistema de importación nuclear es probablemente un participante que puede verse directamente alterado por la presencia exacerbada de especies reactivas y con esto impedir el ingreso y acumulación del Nrf2 a los 90 d de tratamiento.

6.2. SÍNTESIS DE NEUROMELANINA

La pérdida de la capacidad protectora del sistema de defensa antioxidante por efecto del tratamiento con ozono se ve reflejada en la producción de neuromelanina.

En el metabolismo de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, se requiere de metales como el hierro y se sabe con detalle por trabajos de investigación, que si el hierro es quelado, por ejemplo con una desferroxamina, se disminuye la

posibilidad de formación de radicales libres mediados por éste y en paralelo se observa también un decremento en la formación de neuromelanina (He et al., 2011). Con esto explicamos que el incremento gradual de neuromelanina que se presenta a los 7 d y 15 d de tratamiento, es una forma de respuesta del sistema ante al incremento del ambiente oxidativo causado por la exposición a ozono. De igual forma podemos observar que en esta etapa se incrementa proporcionalmente la expresión de la enzima Trp-2 según lo esperado por resultados donde se observa el papel de la Trp-2 en la oxidación de metabolitos que son precursores de neuromelanina (Okun, 1996; Méndez, 2004). Lo anterior indica que en nuestro modelo animal el sistema está incrementando la expresión de la enzima y la formación de neuromelanina de se debe por lo menos a la vía enzimática de oxidación de la dopamina. Sin embargo los reportes indican que la principal vía de formación es la de autooxidación de dopamina (Méndez, 2004) por lo que probablemente en nuestro modelo coexistan ambas vías. Además trabajos recientes han demostrado que la síntesis de neuromelanina está favorecida por la vía de autooxidación de dopamina cuando se encuentra en el citoplasma la dopamina-o-quinona que en un equilibrio de óxido-reducción, se modifica por autooxidación y forma otras quinonas como el leucoaminocromo, que a su vez origina al aminocromo que igualmente da lugar mediante rearrreglos, a las dos quinonas propuestas como las formadoras de neuromelanina, el 5,6-Dihidroxi-indol y el Indol-5,6-quinona (Bisaglia et al., 2010). Con base en nuestras evidencias y las de otros trabajos sugerimos que en nuestros resultados de la etapa de compensación, se presenta un equilibrio de las reacciones de oxido-reducción resultado de una respuesta eficiente del sistema de defensa antioxidante y además el sistema de formación de neuromelanina es capaz de proveer protección contra el daño oxidativo mediante la formación de éste pigmento.

Aunque la presencia de las especies oxidantes es necesaria para el aumento de la formación de neuromelanina, después de los 30 d de tratamiento se observa que son estas mismas especies las responsables de la disminución significativa de la formación del pigmento. Además se observa una disminución progresiva en la formación de neuromelanina, lo cual indica que el sistema es incapaz de compensar las alteraciones oxidantes y disminuye la formación del pigmento. Las causas son diversas, las reacciones de autooxidación de la dopamina en presencia de L-cisteína, tienen un camino metabólico distinto al que seguiría la dopamina-o-quinona sin la presencia de este aminoácido (Tse et al., 1976, Fornstedt et al., 1986). La cisteína libre en el medio y el mismo glutatión reducido, al coexistir con un aumento de dopamina-o-quinona, experimentan un ataque nucleofílico mediado por ésta y forman conjugados 5-S-cisteinil, como la 5-S-cisteinil dopamina y la 5-S-glutationil-dopamina. Esta última eventualmente es capaz de producir 5-S-cisteinil-dopamina mediante la intervención de una peptidasa (Méndez, 2004). Además éstos dos metabolitos se alejan de la vía metabólica de formación de neuromelanina (Bisaglia et al., 2010) y formarán especies químicas de la familia de las hidrobenzotiazinas como el DHBT-1 mediante reacciones de autooxidación. Lo anterior muestra que a pesar del mantenimiento de la expresión de la Trp-2 en esta segunda etapa, el sistema no es capaz de resarcir la disminución de formación de neuromelanina. En la Enfermedad de Parkinson también se presenta el fenómeno en el que disminuye la neuromelanina y se agrega un fenómeno de neurodegeneración selectiva de las células dopaminérgicas. Es posible que en las neuronas dopaminérgicas de los pacientes con Enfermedad de Parkinson, ocurran fenómenos similares a los observados en este trabajo (cambios en el sistema de

defensa antioxidante y formación de neuromelanina), tomando en cuenta que también cursan con el establecimiento de un estado de estrés oxidativo, como se observa en la etapa de descompensación de nuestro modelo animal.

Además en los experimentos de inmunohistoquímica e histoquímica se observó un patrón característico a los 90 d de tratamiento y fue la disminución de la población celular. Esto tiene relación directa con la pérdida progresiva de células que caracteriza a las enfermedades neurodegenerativas y su reducido número de neuronas sobrevivientes en etapas avanzadas. En diversos estudios se puede observar que existe muerte neuronal cuando se acumulan de forma crítica las alteraciones que genera el establecimiento de un estado de estrés oxidativo. Para el caso de este trabajo es importante observar que una de las consecuencias del aumento del ambiente oxidativo es la interacción de las quinonas de dopamina con los grupos tiol, que como ya hemos visto originarán quinonas del tipo de la 5-S-glutationil-dopamina, secuestrando al glutatión y formando posteriormente a la 5-S-cisteinil-dopamina. Existen mecanismos de muerte neuronal que se activan cuando se forman éstos conjugados y ocurren básicamente por dos procesos: mediante las alteraciones que comprometen el metabolismo energético neuronal y mediante la activación de mecanismos de apoptosis. Los conjugados de quinonas de dopamina con el grupo tiol, ejemplo es la 5-S-Cisteinil-dopamina, llevan a la formación de especies químicas del tipo de las benzotiazinas como el DHBT-1 (extensamente estudiado como un bloqueador del complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial) y también llevan al inicio de procesos apoptóticos a través de la activación de la caspasa 3 (Li and Dryhurst, 1997, Shen et al., 1997, Spencer et al., 2002).

Adicionalmente sabemos que la inhibición de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, acelera la formación de especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno y que ambos pueden dar lugar a radicales como el hidroxilo y el peroxinitrito, que son una importante amenaza oxidativa para la célula. Con todo lo anterior se explica la disminución significativa en el número de células a los 90 d de tratamiento.

Estos resultados llevan a sugerir que a los 30 d de tratamiento se establece un punto de no retorno en el cual se instaura un estado de estrés oxidativo que altera completamente la homeostasis celular en nuestro modelo experimental, además el sistema es incapaz readaptarse a los cambios oxidativos y prevenir los fenómenos que llevan a la neurodegeneración de la sustancia nigra.

Finalmente con este trabajo se observa el impacto negativo de la exposición a ozono, que representa una forma real y actual de fotocontaminación que atañe extensamente a los asentamientos urbanos y cuyas consecuencias pueden ser semejantes a las observadas en nuestro modelo animal. Puede existir una relación entre el ozono troposférico de las grandes urbes y los casos de pacientes con neurodegeneración y ser de difícil reconocimiento por tratarse de una alteración muy silenciosa hasta el momento en que se manifiesta, es decir cuando es irreversible.

7. CONCLUSIONES

1. El estrés oxidativo causado en ratas por la exposición a bajas dosis de ozono, produce alteraciones en las concentraciones de glutatión y de la relación entre sus formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG).
2. El aumento de la expresión de la enzima γ -GCS a partir de los 30 d de tratamiento no es capaz de incrementar las concentraciones de glutatión.
3. El aumento de la inmunoreactividad de la 3-NT está directamente relacionada con el aumento de los días de exposición a ozono.
4. En nuestro modelo, la Trp-2, se asocia con el aumento del estrés oxidativo generado por la exposición a ozono.
5. El estrés oxidativo en nuestro modelo incrementa la presencia de neuromelanina hasta los 15 días de exposición a ozono.
6. Los resultados de éste trabajo, indican que la exposición a ozono se relaciona con los cambios neurodegenerativos de la sustancia nigra de rata.

8. APÉNDICE

Prueba de Levene

Estadística Prueba de Levene

Tabla 8. Prueba estadística de Levene

Variables dependientes	Prueba de Levene	P valor
Glutación total	14.120	0.000
GSH	6.379	0.000
GSSG	4.611	0.003
GPx	5.890	0.001
Gr	2.863	0.031
γ -GCS	1.739	0.200
Nrf2	7.896	0.002
Trp-2	1.212	0.361
3-NT	3.221	0.045
γ -GCS pixeles positivos	4.023	0.022
Nrf2 pixeles positivos	8.724	0.001
Trp-2 pixeles positivos	2.544	0.086
3-NT pixeles positivos	3.904	0.025
Neuromelanina	11.585	0.000
Neuromelanina positivos	2.278	0.090

Con estos resultados se observa que la hipótesis alterna (H1) no se puede rechazar en la mayoría de los grupos por lo que se concluye que no se presenta homocedasticidad, únicamente en 4 grupos sombreados con amarillo se puede aceptar la hipótesis nula que afirma la homogeneidad de varianzas, sin embargo, para aplicar una prueba robusta en la que se incluyan todos los grupos de variables dependientes, se decide que las pruebas estadísticas de elección serán de naturaleza no paramétrica. Por esta razón se graficaron en todos los grupos las medianas calculadas para cada uno.

Para el contraste de las k medianas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis de la siguiente forma:

H0: las k medianas son todas idénticas
H1: al menos una de las k medianas son diferentes

Tomando en cuenta el alfa mínimo del 5% (.05) se procede a realizar la prueba de contraste obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 9. Prueba estadística de Kruskal-Wallis

Variables dependientes	P valor
Glutación total	0.001
GSH	0.000
GSSG	0.000
GPx	0.000
Gr	0.000
γ -GCS	0.007
Nrf2	0.007
Trp-2	0.018
3-NT	0.007
γ -GCS pixeles de marca	0.006
Nrf2 pixeles de marca	0.006
Trp-2 pixeles de marca	0.006
3-NT pixeles de marca	0.006
Neuromelanina	0.001
Neuromelanina pixeles de marca	0.000

Con estos resultados obtenidos podemos rechazar la hipótesis nula de igualdad de las medianas por lo que se concluye que hay diferencia significativa entre los grupos experimentales de cada una de las variables dependientes de estudio.

Para la estadística central de este trabajo se utilizó la prueba de U de Mann Whitney para identificar a los grupos experimentales que difieren respecto al grupo control y observar las diferencias significativas respecto a este grupo:

Nivel investigativo: relacional

Objetivo estadístico: comparativo

Variable de estudio: numérica

Tabla 10. Prueba estadística de U de Mann Whitney

Variables dependientes comparados contra el grupo control	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d
Glutación total	0.200	0.010	0.262	0.423	0.004
GSH	0.004	0.522	0.006	0.004	0.004
GSSG	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
GPx	0.004	0.423	0.025	0.006	0.004
Gr	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
γ -GCS	0.046	1.000	0.046	0.046	0.046
Nrf2	0.046	0.050	0.050	0.050	0.513
Trp-2	0.046	0.046	0.046	0.046	0.268
3-NT	0.050	0.050	0.046	0.050	0.050
γ -GCS pixeles de marca	0.050	0.275	0.050	0.050	0.050
Nrf2 pixeles de marca	0.050	0.050	0.050	0.050	0.127
Trp-2 pixeles de marca	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
3-NT pixeles de marca	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Neuromelanina	0.021	0.021	0.309	0.029	0.021
Neuromelanina pixeles de marca	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021

Con estos resultados se observa que los valores sombreados no representan diferencia significativa respecto al control, sin embargo el resto sí. Estos valores se pueden observar en las gráficas correspondientes a cada variable de estudio.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. (2005). Reactive oxygenspecies and development in microbialeukaryotes. *Trends Microbiol*, 13: 111- 118.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual review of neuroscience* 9:357-381.
- Arner ES, Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* 267:6102-6109.
- Bandopadhyay R, de Belleruche J (2010) Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones. *Trends in molecular medicine* 16:27-36.
- Barcia C, Sanchez Bahillo A, Fernandez-Villalba E, Bautista V, Poza YPM, Fernandez-Barreiro A, Hirsch EC, Herrero MT (2004) Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia* 46:402-409.
- Berglund M (1993) Health risk evaluation of nitrogen oxides. Exposure. *Scandinavian journal of work, environment & health* 19 Suppl 2:14-20.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2005) Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Experimental neurology* 191 Suppl 1:S17-27.
- Bhalla DK (1996) Alteration of alveolar macrophage chemotaxis, cell adhesion, and cell adhesion molecules following ozone exposure of rats. *Journal of cellular physiology* 169:429-438.
- Bhalla, D. K., Hoffman, L. A., and Pearson, A. C. (1996). Modification of macrophageadhesion by ozone: Role of cytokines and cell adhesion molecules, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 796:38–46.
- Bisaglia M, Soriano ME, Arduini I, Mammi S, Bubacco L (2010) Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease. *Biochimica et biophysica acta* 1802:699-706.
- Bove J, Zhou C, Jackson-Lewis V, Taylor J, Chu Y, Rideout HJ, Wu DC, Kordower JH, Petrucelli L, Przedborski S (2006) Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling. *Annals of neurology* 60:260-264.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* 24:197-211.
- Bridelli MG, Tampellini D, Zecca L (1999) The structure of neuromelanin and its iron binding site studied by infrared spectroscopy. *FEBS letters* 457:18-22.
- Brighton T E. (1992). Holding pathways determined using disulfide bonds. *Protein Folding* (ed T E Creighton), W H Freeman, New York pp 301-350
- Bromberg PA, Koren HS (1995) Ozone-induced human respiratory dysfunction and disease. *Toxicology letters* 82-83:307-316.
- Carini R, Bellomo G, Paradisi L, Dianzani MU, Albano E (1996) 4-Hydroxynonenal triggers Ca²⁺ influx in isolated rat hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 218:772-776.
- Carstam R, Brinck C, Hindemith-Augustsson A, Rorsman H, Rosengren E (1991) The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochimica et biophysica acta* 1097:152-160.

- Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V, Recanatini M, Melchiorre C (2008) Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of medicinal chemistry* 51:347-372.
- Céspedes M, Ela M. (1996) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. *RevCubana InvBiomed*, 15(2),75-8.
- Chen Y, Swanson RA (2003) The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *Journal of neurochemistry* 84:1332-1339.
- Clancy CM, Simon JD. (2001) Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy. *Biochemistry*, 40,13353-60.
- Cooper, A.J.L. (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* (Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L. & Kunk, L.M., eds), pp. 1195-1230.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Vanwoert MH, Sakamoto A (1964) Melanogenesis and Extrapyrmidal Diseases. *Federation proceedings* 23:713-718.
- Cuervo AM, Wong ES, Martinez-Vicente M (2010) Protein degradation, aggregation, and misfolding. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25 Suppl 1:S49-54.
- D'Ischia M, et al. (1995). Colourless products of melanocytes activity: what role? *Melanoma Res*, 5, 19.
- D'Ischia M, Napolitano A, Prota G. (1991). Peroxidase as an alternative to tyrosinase in the oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindoles to melanin(s). *BiochimBiophysActa*, 1037, 423-30.
- D'Ischia M, Napolitano A, Pezzella A et al. (2005). 5,6- Dihydroxyindoles and indole-5,6-diones. En: *Advances in heterocyclic Chemistry*. (Katritzsky A, eds), 891-63
- Danielson UH, Esterbauer H, Mannervik B (1987) Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *The Biochemical journal* 247:707-713.
- de Castro IP, Martins LM, Tufi R (2010) Mitochondrial quality control and neurological disease: an emerging connection. *Expert reviews in molecular medicine* 12:e12.
- de Vries J, Hempenius RA, Rietjens IM (1994) Ozone-induced lung toxicity: mediated by ozonides? *Toxicology letters* 72:243-246.
- Dellinger B, Pryor WA, Cueto R, Squadrito GL, Hegde V, Deutsch WA (2001) Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chemical research in toxicology* 14:1371-1377.
- Denu JM, Tanner KG (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37:5633-5642.
- Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P (2001) Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3404-3409.
- Double KL, Zecca L, Costi P, Mauer M, Griesinger C, Ito S, Ben-Shachar D, Bringmann G, Fariello RG, Riederer P, Gerlach M (2000) Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *Journal of neurochemistry* 75:2583-2589.

- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European journal of biochemistry / FEBS* 267:4912-4916.
- Dumitriu A, Moser C, Hadzi TC, Williamson SL, Pacheco CD, Hendricks AE, Latourelle JC, Wilk JB, Destefano AL, Myers RH (2012) Postmortem Interval Influences alpha-Synuclein Expression in Parkinson Disease Brain. *Parkinson's disease* 2012:614212.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11:81-128.
- Faucheux BA, Martin M-E, Beaumont C, Hauw J-J, Agid Y, Hirsch EC (2003a) Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 86:1142-1148.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain : a journal of neurology* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Foley JM, Baxter D (1958) On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 17:586-598.
- Fornstedt B, Rosengren E, Carlsson A (1986) Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology* 25:451-454.
- Freeman BA, Mudd JB (1981) Reaction of ozone with sulfhydryls of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 208:212-220.
- Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Archives of biochemistry and biophysics* 247:1-11.
- Gerlach M, Trautwein AX, Zecca L, Youdim MB, Riederer P (1995) Mossbauer spectroscopic studies of purified human neuromelanin isolated from the substantia nigra. *Journal of neurochemistry* 65:923-926.
- Gerrity TR, Weaver RA, Berntsen J, House DE, O'Neil JJ (1988) Extrathoracic and intrathoracic removal of O₃ in tidal-breathing humans. *J Appl Physiol* 65:393-400.
- Graeber MB, Moran LB (2002) Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol* 12:385-390.
- Graham DG (1979) On the origin and significance of neuromelanin. *Archives of pathology & laboratory medicine* 103:359-362.
- Gris, Javier H; Dragonetti, Martín A; Fernandez, Beatriz M y Moglioni, Albertina G. (2009). Modelado Molecular e Interacción Enzima-Ligando (Docking) de Antiinflamatorios Derivados de 4-Hidroxi 1,2-Benzotiazinas-3-Carboxamidas, 1,1-Dióxido. *Inf. Tecnol*, 20(4), 51-61
- Gutteridge JM, Halliwell B (1992) Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free radical biology & medicine* 12:93-95.
- Haavik J (1997) L-DOPA is a substrate for tyrosine hydroxylase. *Journal of neurochemistry* 69:1720-1728.
- Haddad EB, Salmon M, Sun J, Liu S, Das A, Adcock I, Barnes PJ, Chung KF (1995) Dexamethasone inhibits ozone-induced gene expression of macrophage inflammatory protein-2 in rat lung. *FEBS letters* 363:285-288.

- Hansberg W (1999). La biología del dioxígeno en singulete. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, FES Zaragoza, UNAM, 2, 47-55.
- Hansberg W (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. En: Cea BA, del Arenal MIP, Riveros RH, Vázquez CE: Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México, 19-54.
- He AY, Qiu LJ, Gao Y, Zhu Y, Xu ZW, Xu JM, Zhang ZH (2011) The role of oxidative stress in neuromelanin synthesis in PC12 cells. *Neuroscience* 189:43-50.
- Hempenius, R. A., de Vries, J., and Rietjens, I. M.(1992). Molecular orbital study on the glutathione-dependent detoxication of ozonides, *Eur. J. Pharmacol*, 228,207–211.
- Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological reviews* 80:953-978.
- Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M, Morita I (2003) Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *Journal of neural transmission* 110:1337-1348.
- Hindle JV (2010) Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age and ageing* 39:156-161.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology* 8:382-397.
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of biological chemistry* 264:13963-13966.
- Ikemoto K, Nagatsu I, Ito S, King RA, Nishimura A, Nagatsu T (1998) Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neuroscience letters* 253:198-200.
- Ito S (1992) Melanin-related metabolites as markers of melanoma: a review. *The Journal of dermatology* 19:802-805.
- IUPAC Recommendations 1995: Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure. Pág. 1362
- Jakoby WB, Ziegler DM. (1990). The enzymes of detoxication. *J Biol Chem*;265:20715-8.
- Jenner P, Olanow CW (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47:S161-170.
- Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82-86.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology* 47:89-116.
- Klaassen CD, Reisman SA (2010) Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicology and applied pharmacology* 244:57-65.
- Kleeberger SR (1995) Genetic susceptibility to ozone exposure. *Toxicology letters* 82-83:295-300.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and cellular biology* 26:221-229.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borron JC, Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein 1

- (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO journal* 13:5818-5825.
- Koch WH, Chedekel MR (1987) Photochemistry and photobiology of melanogenic metabolites: formation of free radicals. In: *Photochemistry and photobiology*, vol. 46, pp 229-238.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM (2011) Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing research reviews* 10:205-215.
- Kropf AJ, Bunker BA, Eisner M, Moss SC, Zecca L, Stroppolo A, Crippa PR (1998) X-ray absorption fine-structure spectroscopy studies of Fe sites in natural human neuromelanin and synthetic analogues. *Biophysical journal* 75:3135-3142.
- Langston JW, Forno LS, Tetrad J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology* 46:598-605.
- Lauretani F, Semba RD, Bandinelli S, Ray AL, Guralnik JM, Ferrucci L (2007) Association of low plasma selenium concentrations with poor muscle strength in older community-dwelling adults: the InCHIANTI Study. *The American journal of clinical nutrition* 86:347-352.
- Lee JM, Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37:139-143.
- Li H, Dryhurst G (1997) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 69:1530-1541.
- Lii CK, Chai YC, Zhao W, Thomas JA, Hendrich S (1994) S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* 308:231-239.
- Liu Y, Edwards RH (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annual review of neuroscience* 20:125-156.
- Liu Y, Simon JD (2003) Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16:606-618.
- Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H (2009) Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. In: *Molecular neurodegeneration*, vol. 4, p 24.
- Marsden CD, Obeso JA (1994) The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 117 (Pt 4):877-897.
- Martínez SM, Andrés B, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J (2006) Current concepts on glutathione metabolism. usefulness of stable isotopes of its homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 40 (1): 45-51
- Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH (1995) Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease. In: *Journal of neurochemistry*, vol. 64, pp 1645-1654.

- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 108:652-659.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *The Journal of biological chemistry* 244:6049-6055.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- Méndez E. (2004) Dopamine: A double-edged sword for the human brain, en: Pandalai S.G. *Recent Research Developments in life sciences.*, primera edición, Vol 2: 217-246.
- Menzel DB (1970) Toxicity of ozone, oxygen, and radiation. *Annual review of pharmacology* 10:379-394.
- Merlini G, Bellotti V (2003) Molecular mechanisms of amyloidosis. *The New England journal of medicine* 349:583-596.
- Miller FJ, Menzel DB, Coffin DL (1978) Similarity between man and laboratory animals in regional pulmonary deposition of ozone. *Environmental research* 17:84-101.
- Moinova HR, Mulcahy RT (1998) An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *The Journal of biological chemistry* 273:14683-14689.
- Napolitano A, Memoli S, Nappi AJ et al. (1996). 5-S-cysteinildopa, a diffusible product of melanocyte activity, is an efficient inhibitor of hydroxylation/oxidation reactions induced by the Fenton system. *BiochimBiophys Acta*, 1291,75-82.
- Napolitano A, Palumbo A, Misuraca G et al. (1993). Inhibitory effect of melanin precursor on arachidonic acid peroxidation. *BiochimBiophysActa*, 1168, 175-80.
- Napolitano A, Vincenzi MR, Di Donato P, Monfrecola G, Prota G (2000) Microanalysis of melanins in mammalian hair by alkaline hydrogen peroxide degradation: identification of a new structural marker of pheomelanins. *The Journal of investigative dermatology* 114:1141-1147.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43:233-260.
- Nicolaus RA, Sulla, (1999). DHImelanina. *Rend Acc Sci Fis Mat Napoli*; 66:85.
- Nicolaus RA. (1997) Coloured organic semiconductors: melanins *Rend AccSci Fis Mat Napoli*; 64: 325-360.
- Offen D, Ziv I, Barzilai A, Gorodin S, Glater E, Hochman A, Melamed E (1997) Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochemistry international* 31:207-216.
- Okun MR (1996) The role of peroxidase in mammalian melanogenesis: a review. *Physiological chemistry and physics and medical NMR* 28:91-100; discussion 100-101.
- Packer L, Sies H. (2000). Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone. *Meth. Enzymol.* Volume 319. Academic Press, San Diego, USA
- Palumbo A, Solano F, Misuraca G et al. (1991) Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ion on the rearrangement of dopachrome. *BiochimBiophysActa*, 1115, 1-5.
- Patra AL, Grady MA, Miller FJ (1984) Identification system for airways in lung models: a note. *The Anatomical record* 208:279-281.

- Pawelek JM (1991) After dopachrome? Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society 4:53-62.
- Postuma RB, Gagnon JF, Montplaisir J (2010) Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81:1008-1013.
- Prester T, Holtzclaw WD, Zhang Y, Talalay P (1993) Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2965-2969.
- Prota G (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *The Journal of investigative dermatology* 75:122-127.
- Prota G (1988) Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Medicinal research reviews* 8:525-556.
- Prota G et al. (1998). The chemistry of melanins and related metabolites. En: *The Pigmentary System and its Disorders*. (Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, eds). New York: Oxford University Press, 307.
- Prota G. (1993). Regulatory mechanism of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept. *J Invest Dermatol*; 100: 156-615
- Prota, G. (1980). Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol*, 75(1), 122-127.
- Prota, G. (1988). Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev*, 8(4), 525-556.
- Pryor WA (1994) Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free radical biology & medicine* 17:451-465.
- Reiter RJ (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:526-533.
- Riley PA. (1999). The great DOPA mystery: the source and significance of FDOPA in phase I melanogenesis. *Cell Mol Biol*, 45, 951-60.
- Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzman R, Lopez-Vidal Y, Rodriguez-Martinez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Perez M, Raisman-Vozari R (2010) Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 113:187-197.
- Roehm JN, Hadley JG, Menzel DB (1971) Oxidation of unsaturated fatty acids by ozone and nitrogen dioxide. A common mechanism of action. *Archives of environmental health* 23:142-148.
- Rorsman H, Pavel S. (1990). Metabolic markers and melanoma. En: *Cutaneous Melanoma Biology and Management*. (Cascineli N, Santinami M, Veronesi U, eds). Milano: Masson, 79.
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *The Journal of biological chemistry* 266:11632-11639.
- Sandstrom T (1995) Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 8:976-995.
- Schmitz S, Thomas PD, Allen TM, Poznansky MJ, Jimbow K (1995) Dual role of melanins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of

- ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation. *Photochemistry and photobiology* 61:650-655.
- Shen XM, Zhang F, Dryhurst G (1997) Oxidation of dopamine in the presence of cysteine: characterization of new toxic products. *Chemical research in toxicology* 10:147-155.
- Shibata T, Prota G, Mishima Y (1993) Non-melanosomal regulatory factors in melanogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 100:274S-280S.
- Snyder H, Wolozin B (2004) Pathological proteins in Parkinson's disease: focus on the proteasome. *Journal of molecular neuroscience* : MN 24:425-442.
- Spencer JP, Whiteman M, Jenner P, Halliwell B (2002) 5-s-Cysteinyl-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *Journal of neurochemistry* 81:122-129.
- Strohmaier H, Hinghofer-Szalkay H, Schaur RJ (1995) Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as a physiological component in human plasma. *Journal of lipid mediators and cell signalling* 11:51-61.
- Swartz HM, Sarna T, Zecca L (1992) Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Annals of neurology* 32 Suppl:S69-75.
- Tansey MG, Goldberg MS (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of disease* 37:510-518.
- Theodore M, Kawai Y, Yang J, Kleshchenko Y, Reddy SP, Villalta F, Arinze IJ (2008) Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *The Journal of biological chemistry* 283:8984-8994.
- Tse DC, McCreery RL, Adams RN (1976) Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *Journal of medicinal chemistry* 19:37-40.
- Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS (2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290:1571-1574.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1993a, Air Quality Criteria for Oxides of Nitrogen, Vol. I, Report no. EPA/600/8-91/049aF, U.S. EPA, Research Triangle Park, NC.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1993b, Air Quality Criteria for Oxides of Nitrogen, Vol. III, Report no. EPA/600/8-91/049cF, U.S. EPA, Research Triangle Park, NC.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996a, Air Quality Criteria for Ozone and Related Photochemical Oxidants, Vol. I, Report no. EPA/600/P-93/004aF, U.S. EPA, Research Triangle Park, NC.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996b, Air Quality Criteria for Ozone and Related Photochemical Oxidants, Vol. I II, Report no. EPA/600/P-93/004cF, U.S. EPA, Research Triangle Park, NC.
- Uversky VN, Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Millett IS, Doniach S, Lyubchenko YL, Fink AL (2005) Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain research Molecular brain research* 134:84-102.
- Victorin K (1992) Review of the genotoxicity of ozone. *Mutation research* 277:221-238.
- Vives-Bauza C, de Vries RL, Tocilescu MA, Przedborski S (2009) Is there a pathogenic role for mitochondria in Parkinson's disease? *Parkinsonism & related disorders* 15 Suppl 3:S241-244.

- Vostal JJ (1994) Physiologically based assessment of human exposure to urban air pollutants and its significance for public health risk evaluation. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 4:101-106.
- Zecca L, Costi P, Mecacci C, Ito S, Terreni M, Sonnino S (2000) Interaction of human substantia nigra neuromelanin with lipids and peptides. *Journal of neurochemistry* 74:1758-1765.
- Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, Tampellini D (2002) The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS letters* 510:216-220.
- Zecca L, Pietra R, Goj C, Mecacci C, Radice D, Sabbioni E (1994) Iron and other metals in neuromelanin, substantia nigra, and putamen of human brain. *Journal of neurochemistry* 62:1097-1101.
- Zecca L, Swartz HM (1993) Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. *Journal of neural transmission Parkinson's disease and dementia section* 5:203-213.
- Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D (2001) Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Molecular pathology* : MP 54:414-418.
- Zeise L. (1994) Analytical methods for characterization and identification of eumelanins. En: *Melanin: Its Role in Human Photoprotection*. (Zeise L, Chedeckel MR, Fitzpatrick TB, eds), Overland Park (Kansas): Valdenmar Publishing Company,65.
- Zhivotovsky B, Orrenius S (2010) Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease. *Experimental cell research* 316:1374-1383.
- Zhu W, Li X, Xie W, Luo F, Kaur D, Andersen JK, Jankovic J, Le W (2010) Genetic iron chelation protects against proteasome inhibition-induced dopamine neuron degeneration. *Neurobiology of disease* 37:307-313.
- Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, Lucius R, Wilms H, Sulzer D, Ito S, Wakamatsu K, Zecca L (2004) The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 17:610-617.