



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización del efecto de 3-hidroxikinurena *per se* y  
bajo condiciones pro-oxidantes en cerebro de rata: un  
estudio *in vitro* e *in vivo*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Daniela Ramírez Ortega



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Verónica Pérez de la Cruz

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre  
Teléfono  
Universidad  
Facultad  
Carrera  
Número de cuenta

### 1. Datos del alumno

Ramírez  
Ortega  
Daniela  
56 54 45 55  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307033770

### 2. Datos del tutor

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 2. Datos del tutor

Doctora  
Verónica  
Pérez  
De la Cruz

### 3. Datos del sinodal 1

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 3. Datos del sinodal 1

Doctor  
José  
Pedraza  
Chaverri

### 4. Datos del sinodal 2

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 4. Datos del sinodal 2

Doctor  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

### 5. Datos del sinodal 3

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 5. Datos del sinodal 3

Doctor  
Paul  
Carrillo  
Mora

### 6. Datos del sinodal 4

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 6. Datos del sinodal 4

Maestra en Ciencias  
Irma Daniela  
Silva  
Adaya

### 8. Datos del trabajo escrito

Título

### 8. Datos del trabajo escrito

Caracterización del efecto de 3-  
hidroxikinurenina per se y bajo condiciones  
pro-oxidantes en cerebro de rata: un estudio  
*in vitro* e *in vivo*.

Número de páginas

41 p

Año

2013

# Caracterización del efecto de 3-hidroxi-kinurenina *per se* y bajo condiciones pro-oxidantes en cerebro de rata: un estudio *in vitro* e *in vivo*.

## Índice

### Contenido

Índice.....	3
Abreviaturas.....	5
Ácido dietilentriaminopentaacético .....	5
Resumen.....	7
Introducción .....	8
Vía de las kinureninas.....	8
Catabolismo del triptófano.....	9
Metabolitos de la vía de la kinurenina .....	10
3-hidroxi-kinurenina .....	11
Estrés oxidativo .....	13
Justificación .....	16
Hipótesis .....	16
Objetivo general .....	16
Objetivos particulares .....	16
Material y Métodos.....	17
Reactivos .....	17
Animales .....	17
Experimentos de química combinatoria .....	18
Ensayo de atrapamiento de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	18
Ensayo de atrapamiento de radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) .....	18
Ensayo de atrapamiento de anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).....	19
Ensayo de atrapamiento de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) .....	19
Ensayo de quelación.....	20
Ensayo de degradación de DNA.....	20
Ensayo de degradación de proteína.....	21
Experimentos <i>in vitro</i> .....	21
Cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ERO).....	22

Determinación de peroxidación de lípidos .....	22
Estimación de funcionalidad celular .....	22
Experimentos <i>in vivo</i> .....	23
Experimentos de conducta .....	23
Bioquímica .....	24
Estadística.....	24
Resultados.....	25
Experimentos de química combinatoria .....	25
Capacidad atrapadora de 3-HK .....	25
Ensayo de quelación.....	25
Degradación de DNA y de proteína inducida por $\bullet$ OH.....	26
Experimentos <i>in vitro</i> .....	27
ERO .....	27
Peroxidación de lípidos.....	28
Experimentos <i>in vivo</i> .....	30
Conducta de giro .....	31
Bioquímica .....	31
Evaluación histológica.....	32
Discusión .....	34
Conclusiones .....	36
Perspectivas .....	36
Referencias.....	37

## Abreviaturas

• 3-HAA	Ácido 3-hidroxi-antranílico
• 3-HK	3-hidroxikinurenina
• AA	Ácido antranílico
• BSA	Albúmina de suero bovino
• CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
• DCF-DA	2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato
• DFO	Deferoxamina mesilato
• DCF	Dicloro-fluoresceína
• DNA	Ácido desoxiribonucleico
• DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
• EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
• ERO	Especies reactivas del oxígeno
• Fe <sup>2+</sup>	Fierro
• FeSO <sub>4</sub>	Sulfato ferroso
• H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
• HCl	Ácido clorhídrico
• HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
• H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
• IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
• IC50	Concentración efectiva 50
• KAT	Kinurenina amino transferasa
• KCl	Cloruro de potasio
• KNO <sub>2</sub>	Nitrito de potasio
• KYNA	Ácido kinurénico
• MAP	Cinasas activadas por mitógeno
• MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
• MnO <sub>2</sub>	Óxido de manganeso
• MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dibásico de sodio
• NaCl	Cloruro de sodio
• NAD <sup>+</sup>	Nicotin adenin dinucleótido

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Fosfato monobásico de sodio
- $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  Sulfato ferroso amoniacal
- $\text{NaOH}$  Hidróxido de sodio
- NBT Nitroazul de tetrazolio
- NMDA N-metil-D-aspartato
- $\text{O}_2$  Singulete de oxígeno
- $\text{O}_2^{\cdot-}$  Anión superóxido
- $\cdot\text{OH}$  Radical hidroxilo
- $\text{ONOO}^-$  Peroxinitrito
- PBS Buffer de fosfatos
- PMS Metosulfato de fenazina
- QUIN Ácido quinolínico
- SDS Dodecilsulfato sódico
- S.E.M. Error estándar de la media
- SNC Sistema Nervioso Central
- SOD Superóxido dismutasa
- TAE Tris-acético-EDTA
- TBA Ácido tiobarbitúrico
- TBA-RS Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
- TCA Ácido tricloroacético
- TDO Triptófano-2,3-dioxigenasa
- Tris Hidroximetil-aminometano
- VIH Virus de inmunodeficiencia humana
- VK Vía de la Kinurenina

## Resumen

**Antecedentes.** La 3-hidroxicinurenina (3-HK) es un metabolito de la vía de la kinurenina (VK) y ha sido vinculado con diferentes enfermedades neurodegenerativas, ya que sus niveles se encuentran alterados comparados con sujetos normales. En diversos estudios se ha observado un comportamiento dual de esta kinurenina. La 3-HK es capaz de provocar muerte celular en el sistema nervioso central (SNC) con selectividad de región; en cultivos celulares induce signos de apoptosis como la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Okuda, et al., 1998), y en líneas celulares produce lisis y muerte de cultivos neuronales (Eastman y Guilarte, 1989; Okuda, 1996). En experimentos *in vivo* su administración en estriado de ratas provoca daño tisular alrededor del área de inyección (Nakagami et al., 1996). Sin embargo, hay otros informes en donde 3-HK tiene una actividad completamente diferente a los estudios antes mencionados, ya que en homogenados de corteza cerebral se observa una disminución en los parámetros de estrés oxidativo, además de que es capaz de captar radicales peroxilo e hidroxilo, lo que se traduce en un comportamiento de antioxidante por parte de 3-HK. En concordancia con estos hallazgos se ha demostrado su capacidad para atrapar anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) principalmente en los túbulos de Malpigio en insectos (Goshima et al., 1986; Wadano et al.; 1993). **Objetivo.** Dado el controvertido efecto de 3-HK en diferentes muestras biológicas, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de este metabolito *per se* y bajo condiciones pro-oxidantes en tejido cerebral de rata tanto *in vitro* como *in vivo*.

**Metodología.** A través de química combinatoria se evaluó el efecto atrapador de 3-HK para las especies reactivas del oxígeno (ERO): anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Adicionalmente se evaluó su capacidad quelante de  $Fe^{2+}$  y su efecto sobre la degradación de DNA y proteína inducida por  $\cdot OH$ . En los ensayos *in vitro* se evaluó el efecto de 3-HK *per se* así como en condiciones pro-oxidantes generadas por sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) y  $ONOO^-$  sobre la generación de ERO, peroxidación de lípidos (PL) y funcionalidad celular. En los experimentos *in vivo* se realizó una inyección intraestriatal de 3-HK (5 nmol, 10 nmol y 50 nmol) y 5 días post-lesión fue evaluada la conducta de giro, la generación de ERO, PL y la funcionalidad y muerte celular. **Resultados.** Nuestros resultados indican que la 3-HK es capaz de atrapar  $ONOO^-$  y  $\cdot OH$ , además de ser un quelante de  $Fe^{2+}$ . Este efecto correlaciona con la protección que 3-HK mostró ante la degradación del DNA y proteína expuestos a un sistema generador de  $\cdot OH$ . En los experimentos *in vitro* se observó que la 3-HK (50  $\mu M$ ) *per se* disminuye tanto la generación de ERO y PL y es capaz de atenuar el aumento de estos marcadores en los homogenados de rata expuestos a  $ONOO^-$  y  $FeSO_4$ . Tanto  $ONOO^-$  y  $FeSO_4$  disminuyeron la funcionalidad celular y la coadministración con 3-HK fue capaz de prevenir este efecto provocado por las toxinas. 3-HK por sí sólo fue capaz de disminuir ERO y PL por debajo del control. La administración intraestriatal de 3-HK indujo conducta de giro pero no de manera concentración dependiente, lo cual correlacionó con el porcentaje de células degeneradas. La producción de ERO y PL (*in vivo*) disminuyeron comparadas con el control, sin embargo la funcionalidad celular también se encontraba abatida, lo que sugería que los marcadores de daño oxidativo estaban por debajo del control debido al porcentaje de muerte celular.

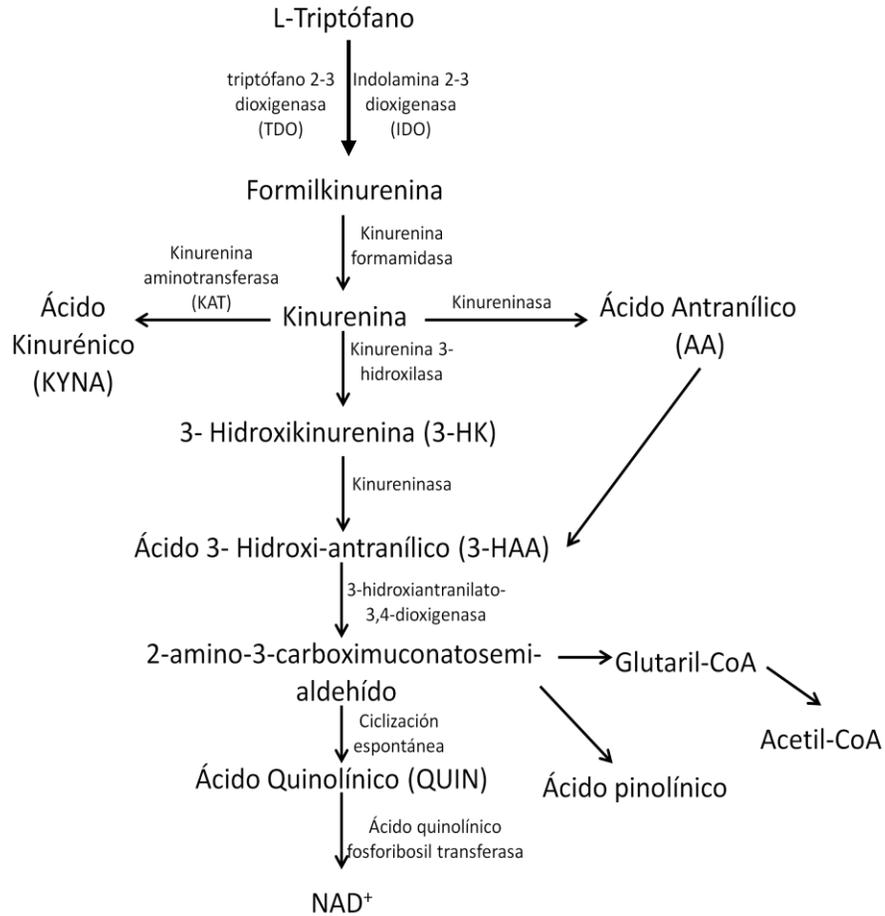
**Conclusiones.** En conjunto estos resultados sugieren que 3-HK es un buen atrapador de ERO en condiciones *in vitro*, sin embargo en condiciones *in vivo* este metabolito es capaz de inducir a la muerte ya sea debido a que, al atrapar ERO forme un complejo tóxico para la célula o bien a que el ambiente al ser diferente promueva su carácter pro-oxidante u otros mecanismos aún no descritos para esta kinurenina.

## Introducción

### Vía de las kinureninas

El triptófano es un aminoácido esencial e indispensable para la síntesis de proteínas, serotonina y niacina, se obtiene solamente por medio de la alimentación y su catabolismo se distribuye en la formación de compuestos no aromáticos del triptófano, (1-2 % por la vía del glutarato), en la vía de la serotonina (1-2 %), en la biosíntesis de melaninas, en la formación de 3-indoxisulfato (3 % por acción de una bacteria intestinal), en la formación de ácido 3-indoleacético (3-4 %); sin embargo la mayor ruta metabólica a través de la cual se degrada más del 90 % del triptófano es la vía de la kinurenina (VK) (Allegri et al., 2003), de hecho, ésta es la ruta principal de la degradación de este aminoácido en mamíferos (Figura 1; Pearson y Reynolds, 1992).

La VK se ha encontrado presente en cerebro e hígado en mamíferos como cerdos, ratas, ratones, conejos y primates (Moroni et al., 1984). El producto final de la vía es la nicotinamida adenin dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), una coenzima involucrada en procesos celulares básicos, funcionando como un donador y aceptor de electrones; esta vía es muy activa, aunque la actividad de cada una de las enzimas involucradas difiere entre especies.



**Figura 1.** Metabolismo del triptófano: vía de la kinurenina (Tomado y modificado de Allegri et al., 2003).

### Catabolismo del triptófano

El metabolismo del triptófano se lleva en primera instancia por dos enzimas: triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), ambas rompen el anillo de triptófano para transformarlo en N-formil kinurenina. La enzima TDO está altamente expresada en el hígado y es capaz de metabolizar L- pero no D-triptófano, en cambio IDO es capaz de metabolizar tanto L- como D-triptófano y se encuentra en diversos órganos del cuerpo humano incluyendo el sistema nervioso central (SNC). Esta enzima es dependiente de anión superóxido e inhibida por óxido nítrico y superóxido dismutasa (Moroni, 1999; Watanabe et al., 1981). El siguiente paso de la vía está a cargo de la kinurenina formidasa, la cual metaboliza a la N-formil kinurenina en L- kinurenina, ésta última es sustrato de cuatro enzimas que dan paso a la formación de tres compuestos diferentes en la vía. Las primeras son las dos isoformas de la

kinurenina aminotransfesa (KAT I y KAT II en humanos), que da paso a la formación de ácido kinurénico (KYNA); la segunda es la kinunerinasa que forma ácido antranílico (AA), la tercera y última es la kinurenina 3-hidroxilasa que forma 3-hidroxikinurenina (3-HK). La kinurenina 3-hidroxilasa es una enzima que se localiza en la membrana exterior de la mitocondria y se ha demostrado que tiene una alta afinidad por el sustrato, lo que sugiere que la kinurenina 3-hidroxilasa metaboliza más L-kinurenina que las demás enzimas (Moroni, 1999; Okuno et al., 1991; Pérez-de la Cruz et al., 2008).

Posteriormente se da la formación de ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) a partir de 3-HK. Además, 3-HAA también puede ser formado a partir de la hidroxilación de AA. El 3-HAA es el sustrato para la 3-hidroxiantranilato-3,4-dioxigenasa, la cual convierte al 3-HAA en un intermediario muy inestable que sufre ciclización espontánea y da lugar a ácido quinolínico (QUIN) (Moroni et al., 1999; Okuno et al., 1991; Pérez-de la Cruz et al., 2008). Posteriormente el QUIN es convertido en NAD<sup>+</sup> por medio de la enzima ácido quinolínico fosforibosil transferasa (Stone, 1993).

## **Metabolitos de la vía de la kinurenina**

La VK ha sido investigada desde los años 50's, en un principio para entender el proceso por el cual se sintetizaba el NAD<sup>+</sup>, pero con el paso del tiempo se asoció a diversos desórdenes neurodegenerativos, ya que muchos de sus metabolitos tienen propiedades neuroactivas (Lapin 1980; Stone 1993).

Los metabolitos de la vía han tenido más interés a lo largo del tiempo debido a que los efectos que causan cuando son administrados en roedores y primates no humanos. Más recientemente, se han mostrados alteraciones en los niveles de algunos metabolitos en enfermedades neurodegenerativas. Uno de los metabolitos de la VK de interés es KYNA, este compuesto es el único antagonista de receptores para NMDA endógeno conocido hasta el momento, tiene la capacidad de inhibir a los receptores  $\alpha 7$ -nicotínicos y ha mostrado ser un agente anticonvulsivo por estas características (Foster et al., 1984). Recientemente se encontró que KYNA es un atrapador de radicales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), además de que es capaz de reducir el daño oxidativo provocado por agentes pro-oxidantes, es por eso que es considerado un antioxidante endógeno (Lugo-Huitrón et al., 2011). Por otra parte el QUIN, es un agonista de receptores NMDA, en modelos experimentales se ha mostrado que es un agente pro-convulsivo y dentro del patrón de daño que genera se encuentra la disfunción mitocondrial progresiva, producción de radicales libres y

muerte celular (Bordelon et al. 1997; Moroni et al., 1984). Los niveles de QUIN están elevados en el líquido cerebrospinal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida y en pacientes con VIH. El QUIN ha sido un buen modelo para simular los síntomas tempranos de la enfermedad de Huntington ya que la lesión en estriado con QUIN en monos producen distonia y disquinesia (Stone, 1993).

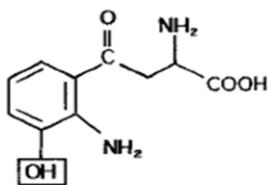
Otro de los metabolitos de interés de esta vía el ácido 3-HAA, éste es uno de los metabolitos de los que existen estudios ambiguos sobre su comportamiento y acción en diferentes experimentos, por ejemplo, es causante de toxicidad en cultivos neuronales sin selectividad de región (Okuda, et al. 1998), es capaz de producir daño a proteínas por la aparente interacción con los metales de éstas, además de producir radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton, pero a la vez, funciona como un sitio de ataque de los radicales hidroxilo (Goldstein et al., 2000). Además, en diversos estudios se observa que 3-HAA puede tener un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa y es capaz de disminuir el consumo de oxígeno (Quagliarello et al., 1964), sin embargo, a pesar de tantos informes que indican que este compuesto es un pro-oxidante, Leipnitz (2007) y su grupo demostraron que 3-HAA funciona como un atrapador de radicales libres y es capaz de disminuir las ERO.

La 3-HK es otra kinurenina que presenta propiedades redox y un comportamiento tanto pro-oxidante como antioxidante.

### **3-hidroxikinurenina**

La 3-hidroxikinurenina (3-HK) es otro de los metabolitos implicados en la vía, es un compuesto endógeno que se encuentra en concentraciones nanomolares en condiciones normales en el SNC, pero que en condiciones patológicas como la enfermedad del Huntington, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades donde la función inmune está alterada, encefalopatía hepática, demencia asociada con VIH y espasmos infantiles, las concentraciones se ven alteradas; por ejemplo, en la enfermedad de Huntington las concentraciones se ven dos o tres veces por arriba de las concentraciones normales. (Pearson y Reynolds, 1992; Guilarte y Eastman, 1993; Okuda et al., 1996).

La 3-HK tiene la estructura de aminoácido, tiene un grupo o-aminofenol (grupo hidroxilo y grupo amino en posición orto) además de un grupo amino, un carboxilo y un grupo carbonilo y por esta razón puede tener dos formas isoméricas: D- y L-3-hidroxikinurenina (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura de 3-hidroxikinurenina

En comparación con otros metabolitos de la vía, se han descrito informes duales con respecto a 3-HK. Algunos trabajos han demostrado que la 3-HK provoca muerte celular en diferentes condiciones dependiendo de la región cerebral que se emplee (estriado, corteza hipocampo o cerebelo), además, es capaz de inducir apoptosis la cual es evidenciada por la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA tanto en cultivos celulares como en experimentos *in vivo* (en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 50 nmol respectivamente) (Okuda et al., 1998; Nakagami et al., 1996). Por otra parte, la 3-HK (200  $\mu\text{M}$ ) en cultivos de líneas celulares neuronales provoca lisis y muerte celular (Eastman y Guilarte, 1989; Okuda, 1996). En experimentos con cristalinos se ha planteado que el mecanismo por el cual se da la toxicidad de 3-HK es por la generación de ERO principalmente peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a través de su autooxidación, llevando así a formar agregados de proteínas (en ausencia de metales), además de funcionar como factores de daño en proteínas por la interacción de 3-HK con los metales de éstas últimas (Goldstein et al., 2000). En concordancia, se ha demostrado que las interacciones que se dan entre los metales y 3-HK (2.2 mM) pueden resultar en la formación de cataratas (Vazquez, 2001).

En cambio, hay otros trabajos en donde la 3-HK tiene una actividad completamente diferente a los estudios antes mencionados, ya que en homogenados de corteza cerebral expuestos a 3-HK (0-100  $\mu\text{M}$ ) se observa una disminución en los parámetros de estrés oxidativo y en cultivos de glioma con 3-HK (100  $\mu\text{M}$ ) la morfología de las células no se ve alterada. Adicionalmente, se mostró que la 3-HK es capaz de captar radicales peroxilo e hidroxilo, lo que se traduce en un comportamiento antioxidante por parte de esta kinurenina. Otro de los informes que apoyan este comportamiento antioxidante de 3-HK es aquel en donde se demostró en homogenados de diferentes partes del cuerpo de *Aldrichina grahami*, se demuestra que 3-HK (0.5-2.0  $\mu\text{g}$ ) puede ser atrapador de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  principalmente en los túbulos de Malpigio. Además en insectos voladores, los cuales tienen alta demanda de oxígeno, la 3-HK (0.06 mM) se comporta como un potente atrapador de radicales libres (Goshima et al., 1986; Wadano et al., 1993).

## Estrés oxidativo

En un organismo sano existe un balance óxido-reducción, pero cuando este desbalance se rompe da paso a el estrés oxidativo que se define, como el desbalance entre la producción de especies reactivas y la actividad de los sistemas antioxidantes; este desbalance se puede deber al exceso de oxidantes en el medio o el mal funcionamiento del sistema antioxidante. (Shukla et al., 2001)

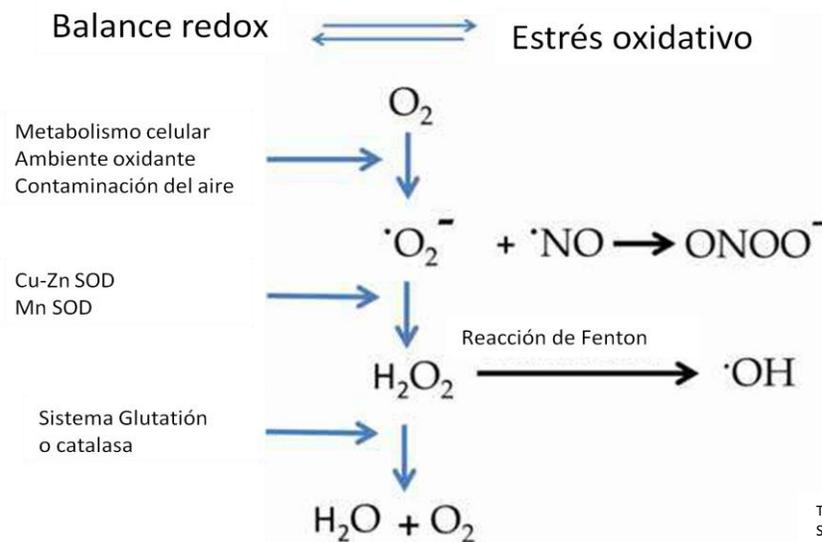
El balance entre los sistemas antioxidantes y la producción de oxidantes se lleva a cabo por la presencia de enzimas, pero cuando este balance es alterado, la célula sufre toxicidad por especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies reactivas del oxígeno (ERO) y radicales libres.

Las ERO son moléculas que pueden interaccionar con componentes celulares y éstas se dividen en especies radicales y no radicales; las primeras son aquellas que tienen un átomo desapareado en la órbita externa y se forman por una ruptura homolítica. Los radicales se forman a partir del oxígeno molecular, que dependiendo de lo que le ocurra a esos electrones desapareados dará paso a otros radicales como el singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ),  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  (no radical) y  $\cdot OH$ . Las especies reactivas del nitrógeno, como el óxido nítrico pueden reaccionar con el  $O_2^{\cdot-}$  y formar el anión  $ONOO^-$  y este a su vez puede dar lugar al ácido peroxinitroso y  $\cdot OH$  (Figura 3. Selva-Rivas et al., 2011).

Las ERO tienen un papel dual en la célula y éste depende del estado redox del organismo, por una parte las ERO participan en vías de señalización ya que median la transducción de señales que regula la respuesta al estrés oxidativo y así son responsables de la expresión de las enzimas antioxidantes y sistemas de defensa relacionados; también son moduladores de la respuesta inflamatoria y son responsables de procesos fisiológicos como la regulación de la constricción vascular y la regulación de la presión del oxígeno. Por ejemplo, las ERO son capaces de activar la vía de las MAP cinasas que a su vez activan proteínas con importancia en la modulación de funciones celulares específicas como expresión de receptores, síntesis de neurotransmisores, producción de neuropéptidos, etc. Sin embargo, se sabe que las ERO tienen efectos nocivos en la célula ya que pueden interactuar con componentes celulares como proteínas, lípidos y DNA. El efecto de la oxidación de proteínas se puede dar a nivel de sitios de unión o la conformación estructural de las proteínas; la oxidación de DNA puede provocar mutaciones y tener un efecto directo en la replicación; la oxidación de lípidos, principalmente ácidos grasos insaturados, puede generar peroxidación de lípidos, los cuales a su vez pueden oxidar a los lípidos cercanos y finalmente generar una reacción en cadena, los productos de esta reacción son el 4-hidroxinonenal y malonaldehído, los cuales sirven como

marcadores de esta reacciones (Selva-Rivas et al., 2011, Coyle y Outtfarcken, 1993; Andersen, 2004).

La producción ERO se da de manera natural dentro de la célula a causa de procesos metabólicos como la oxidación de moléculas pequeñas. Las enzimas son una de las principales fuentes de producción de ERO ya que generas radicales libres durante su ciclo catalítico (xantina oxidasa, triptófano dioxigenasa, etc.). La mitocondria es el organelo que consume más del 90 % de oxígeno de la célula y es el mayor productor de radicales debido al metabolismo del oxígeno que consume. Estructuras celulares como el retículo endoplásmico y la membrana nuclear contienen citocromos (P450 y b5) que son capaces de oxidar a ácidos grasos insaturados. Otra de las fuentes productoras de ERO son los peroxisomas ya que por su alta concentración de oxidasas son fuente de producción de  $H_2O_2$ . Aunado a esto se sabe que también las ERO pueden ser producidas por agentes externos como son los fuentes ambientales como el ozono, pesticidas, hiperoxia, el humo de tabaco, solventes, anestésicos, hidrocarburos aromáticos, etc (Selva-Rivas et al., 2011).



**Figura 3.** Esquema de reacciones oxido-reducción. Reacciones reductoras en un balance redox (izq.) y reacciones oxidantes en un estrés oxidativo (der.)

El estrés oxidativo es importante en el desarrollo en las enfermedades degenerativas como la diabetes o el cáncer pero también en desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, Parkinson o Huntington, incluso en la vejez, no se tiene claro si es una causa o una consecuencia de cada una de ellas, pero todas ellas tienen en común factores como: la función

mitocondrial afectada, daño oxidativo incrementado, presencia de agregados anormales de proteínas, desregulación de la excitotoxicidad y alteración del metabolismo de hierro (Shukla et al., 2011).

El sistema nervioso necesita una alta demanda de oxígeno por su alta actividad, de hecho, el cerebro consume cerca del 20 % del oxígeno consumido por el cuerpo, pero este porcentaje aumenta cuando el cerebro se encuentra en un estado activo; a su vez el sistema nervioso está compuesto de una alta cantidad de lípidos, además de que necesita una alta demanda de oxígeno por su alta actividad, y tiene bajos niveles de enzimas; es por esto que el SNC es muy vulnerable al estrés oxidativo. Es claro que para el buen funcionamiento del SNC es necesario que las conexiones entre células neuronales sean correctas; el estrés oxidativo es capaz de alterar estas conexiones produciendo daño oxidativo, pérdida de procesos (como la comunicación neuronal), la muerte de las sinapsis y la alteración de formación de nuevas células.

Las especies reactivas producen oxidación de lípidos, proteínas y DNA, desacoplamiento de proteínas e incluso cambia la membrana celular produciendo un desbalance neuronal. Smythies (1999) propone que es muy importante un estado redox en la plasticidad cerebral en el cual un ambiente oxidante provoque un estado de estrés, en donde las ERO causan la eliminación de espinas celulares; pero que en un ambiente antioxidante es posible que las sinapsis se conserven e incluso su número aumente. De hecho la neurodegeneración es la pérdida o daño por radicales libres a la estructura y función de neuronas. (Shukla, et al. 2011)

Por todo esto es importante remarcar que la vulnerabilidad de las células en enfermedades neurodegenerativas es alta y es una de las principales causas de la degeneración y muerte celular (Selva-Rivas et al., 2011).

## Justificación

Dado que la VK y sus metabolitos tienen gran importancia en diversas patologías y que existen muchos estudios de un comportamiento dual de 3-HK en diferentes condiciones, es de importancia investigar a profundidad las propiedades de este metabolito en condiciones fisiológicas y en diferentes sistemas que se asemejen a las condiciones patológicas y con esto poder aclarar la función o actividad que tiene este metabolito en cada una de ellas. De tal manera que se pueda describir un mecanismo de acción preciso para 3-HK que sirva para explicar o correlacionar su presencia con diferentes marcadores de daño como el estrés oxidativo.

## Hipótesis

De acuerdo a los grupos funcionales que forman la estructura química de la 3-HK, ésta será capaz de atrapar ERO y de formar complejos con hierro; entonces tendrá un comportamiento como antioxidante en homogenados de tejidos y experimentos *in vivo*

## Objetivo general

- Caracterizar el efecto de 3-HK *per se* y en conjugación con agentes pro-oxidantes como el  $\text{ONOO}^-$  y el  $\text{FeSO}_4$  en diferentes condiciones: *in vitro*, *in vivo* y en sistemas sintéticos generadores de ERO.

## Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad atrapadora de 3-HK sobre cuatro ERO:  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\cdot\text{OH}$ .
- Evaluar la capacidad quelante de 3-HK en un sistema de  $\text{Fe}^{2+}$ .
- Determinar el efecto que tiene 3-HK (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre la degradación de DNA y proteína inducida por  $\cdot\text{OH}$ .

- Evaluar el comportamiento de 3-HK en homogenados de cerebro, hígado y riñón, de manera individual y en presencia de dos pro-oxidantes: ONOO<sup>-</sup> (25 μM) y FeSO<sub>4</sub> (5 μM) a través de la producción de ERO, peroxidación de lípidos y funcionalidad celular.
- Determinar el efecto de la inyección intraestriatal de 3-HK (5 nmol, 10 nmol y 50 nmol) en la conducta de giro cinco días post-lesión.
- Caracterizar el efecto de la inyección intraestriatal de 3-HK en los parámetros de daño oxidativo a través de la producción de ERO, peroxidación de lípidos y la funcionalidad celular.
- Determinar si la inyección intraestriatal con 3-HK lleva a muerte celular.

## Material y Métodos

### Reactivos

3-hidroxiquinurena (3-HK), ácido tiobarbitúrico (TBA), FeSO<sub>4</sub>, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo (MTT) y demás reactivos fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) a excepción del ONOO<sup>-</sup> que fue sintetizado según el método descrito previamente (Beckman et al., 1994). Las soluciones y reactivos (3-HK) se prepararon con agua desionizada obtenida de un sistema purificador (Direct-Q, Millipore) y por medio de sonicación (Branson 2210).

### Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar (250-320 g) a lo largo de los experimentos. Se mantuvieron en cajas de acrílico en presencia de agua y alimento (LabDiet) en condiciones constantes de temperatura y luz (12:12- luz:oscuridad). Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Experimentos de química combinatoria**

Se realizaron experimentos de capacidad atrapadora de 3-HK en sistemas específicos para  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , o  $ONOO^-$  y  $\cdot OH$ ; así como ensayos de quelación de  $Fe^{2+}$  y la determinación del efecto de 3-HK en la degradación de proteína y DNA.

### **Ensayo de atrapamiento de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**

La evaluación del ensayo de capacidad atrapadora de 3-HK está basada en reportes previos (Fontana et al., 2001). La técnica se basa en la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT), en donde un sistema no enzimático de PMS/NADH genera  $O_2^{\cdot-}$ , y esta especie reduce el NBT en sales de formazán, las cuales tienen un color azul-púrpura. Brevemente la mezcla de reacción contiene buffer HEPES (20 mM, pH 7.4), 196  $\mu M$  NADH, 39.2  $\mu M$  NBT, 3.92  $\mu M$  PMS y concentraciones crecientes de 3-HK (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$ ), en un volumen final de 1.275 mL. El NBT, HEPES, NADH, PMS y/o 3-HK se agregaron por separado en una celda, se agitó y se obtuvo la absorbancia de cada una de las muestras cada minuto durante 3 minutos a una longitud de 560 nm en un espectrofotómetro Genesys 8, se calibró a cero con la mezcla en ausencia de 3-HK. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de capacidad atrapadora con respecto al valor máximo de captura.

### **Ensayo de atrapamiento de radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )**

La actividad atrapadora de 3-HK para  $\cdot OH$  se evaluó a través del sistema  $Fe^{3+}$ -EDTA- $H_2O_2$ -desoxirribosa (Floriano-Sánchez et al., 2006; Halliwell et al., 1987), en donde la reacción del complejo EDTA/ $Fe^3$  por reacción con  $H_2O_2$  genera radicales hidroxilo y en presencia de desoxirribosa, forman compuestos que forman un cromógeno rosa en consecuencia de la presencia de TBA. La mezcla de reacción: con un volumen final de 1 ml se compuso de 0.2 mM de ácido ascórbico, desoxirribosa 0.56 mM,  $H_2O_2$  1 mM, amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.4), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.2 mM. Se colocó cada uno de los componentes de la mezcla de reacción en un tubo, se agitaron e inmediatamente se pudieron a incubar durante 1 hr a 37°C. Al finalizar la incubación se agregó 1 ml de mezcla de TBA (conteniendo TBA, ácido tricloroacético 100 % (TCA), ácido clorhídrico concentrado (HCl) y deferoxamina mesilato (DFO) y se puso en un baño de ebullición a 94°C durante 10 min, se dejaron enfriar a

temperatura ambiente y posteriormente se midió la densidad óptica a 532 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al valor máximo obtenido de capacidad atrapadora.

### **Ensayo de atrapamiento de anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)**

El ONOO<sup>-</sup> utilizado se sintetizó de acuerdo a Beckman et al. (1994). Se mezcló por un segundo en un baño de hielo 5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.7 M (preparado en HCl 0.6 M) con 5 ml de nitrito de potasio (KNO<sub>2</sub>) 0.6 M e inmediatamente, se detuvo la reacción con 5 ml de hidróxido de sodio frío (NaOH, 1.2 M). La mezcla se hizo pasar por columnas que contenían 4 g de óxido de manganeso (MnO<sub>2</sub>, prelavadas con 15 ml de NaOH 1.2 M temperatura ambiente durante 20 min). La mezcla obtenida se dejó en un refrigerador de -20°C durante toda la noche. Se recolectó la capa amarilla formada y se almacenó en alícuotas, las cuales se almacenaron en refrigeración y para cada ensayo se determinó la concentración del ONOO<sup>-</sup> por espectrofotometría a 302 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar 1670 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

La capacidad de 3-HK para atrapador al ONOO<sup>-</sup> se evaluó por medio de la oxidación de la DCF-DA inducida por ONOO<sup>-</sup> hacia DCF de la técnica modificada de Crow y Beckman (1996). El sistema tenía un volumen final de 1.45 ml y contenía 14 μM de ácido dietiltriainopentaacético (DTPA), 36.2 μM DCF-DA, concentraciones crecientes de 3-HK (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 μM) y ONOO<sup>-</sup> (35 μM). Cada componente del sistema se colocó en una celda de cuarzo, se agitaron en un vórtex y se obtuvo la densidad óptica a 500 nm durante 3 min cada minuto. Como blanco se utilizó el tubo 100 % en donde la capacidad atrapadora es nula, entonces la oxidación de DCF-DA a DCF es total. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto al máximo obtenido.

### **Ensayo de atrapamiento de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

La habilidad de 3-HK para atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evaluó por medio del método de Long et al. (1999). El método se basa en la formación de un complejo naranja de xilenol-Fe(III) el cual tiene absorción máxima a 560 nm. El sistema que se forma, contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que oxida al Fe(II) en Fe(III) y así se forme el complejo. Se hizo una mezcla de nueve volúmenes de hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol grado HPLC con un volumen de naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM en 0.25 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, los cuales forman el reactivo de Fox. Las diferentes concentraciones de 3-HK (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 μM) se mezclaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75 μM) y metanol grado HPLC en tubos eppendorf e inmediatamente se agregó 900 μL

de reactivo Fox, las muestras se agitaron en el vórtex y se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 15,000 x g durante 10 min y se obtuvo la densidad óptica a 560 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de capacidad atrapadora con respecto al valor máximo obtenido de capacidad atrapadora.

### **Ensayo de quelación**

La capacidad de 3-HK para formar complejos quelantes se comprobó basándose en un trabajo previo (Violler et al., 2000) con modificaciones, esto es a través de complejos coloreados que se forman en presencia de hierro y ferrozina. Para el ensayo se utilizó un amortiguador de acetato de amonio 5M (pH 9.5), ferrozina 5 M, 3HK (5, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu$ M) y una mezcla de:  $\text{FeSO}_4$  (70 mg/100 mL) y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 5mM.

Para el ensayo se pusieron todos los compuestos en tubos eppendorf, se incubaron durante 5 min y posteriormente se leyeron las muestras en un espectrofotómetro Genesys 8 a 562 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de quelación respecto al control positivo (sistema + EDTA) en ausencia de 3-HK.

El principio de este método se basa en la disociación del complejo transferrina-hierro en un medio débilmente ácido. El hierro liberado es reducido a la forma bivalente ( $\text{Fe III} \rightarrow \text{FeII}$ ) por medio del ácido ascórbico. Los iones ferrosos forman un compuesto coloreado con la ferrozina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hierro en la muestra.

### **Ensayo de degradación de DNA**

Para poner a prueba la capacidad de protección de 3-HK en la degradación del DNA, se utilizó un sistema generador de  $\bullet\text{OH}$  compuesto de: ácido ascórbico 1.6 mM, EDTA 0.8 mM y sulfato ferroso amoniacal ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ). Para cada una de las mezclas se utilizó buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.4), la mezcla de ácido ascórbico-EDTA- $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ , 6  $\mu$ L de DNA (obtenido de cola de ratón), 3-HK (5, 10 y 50  $\mu$ M) y para comenzar la generación de  $\bullet\text{OH}$ , se le adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 2 %. Las mezclas se dejaron incubar por 10 minutos y pasado este tiempo se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de buffer de carga (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xileno cianol y 80 % glicerol). Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2 % preparado en Tris-acético-EDTA (TAE, 1x) con 0.5  $\mu$ L de bromuro de etidio. El gel se puso a correr a 70 V durante 1 h. Al finalizar, se visualizó y se obtuvo imagen de cada uno de los geles con luz UV

por medio del sistema BioRad Gel Documentation (Gel Doc 1000 BioRad) y se obtuvo su densitometría utilizando el programa Quantity One 4.6.6. (Galano et al., 2010).

### **Ensayo de degradación de proteína**

Para observar la degradación de proteína generada por  $\bullet\text{OH}$ , se utilizó la detección de la oxidación de la albúmina sérica de bovina (BSA) llevada a cabo por la reacción catalizada por metales, basada y modificada de Koch et al. (1997). Se utilizó una solución, preparada en un buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.4), de ácido ascórbico 1.6 mM, EDTA 0.8 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ . Para cada una de las mezclas se utilizó BSA al 1 %, se le agregó el sistema de ácido ascórbico 1.6 mM-EDTA 0.8 mM- $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  en ausencia o presencia de 3-HK (5, 10 y 50  $\mu\text{M}$ ), posteriormente se agregó 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , esto fue para iniciar la generación de  $\bullet\text{OH}$ , se dejaron incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, al final de la incubación se les adicionó 250  $\mu\text{L}$  de TCA 20 % después, se centrifugaron a 2,795 x g durante 30 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet fue resuspendido con 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M. Luego, para evaluar el daño oxidativo en las proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 30 %. Se tomaron 50  $\mu\text{g}$  del pellet y se mezcló (1:1) con el buffer de carga (10 % glicerol, 2 % SDS, 25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5 % mercaptoetanol, 0.1 % azul de bromofenol), se hirvieron a 100°C por un minuto y posteriormente cada una de las muestras fue cargada en un gel de poliacrilamida al 12 % y la electroforesis corrió a 150 V durante 1 h. Al finalizar el gel fue teñido, para esto se colocó en una solución de azul de Coomassie 2 % durante una hora. Posteriormente se lavó y se dejó en solución desteñidora. Al finalizar este proceso se obtuvieron fotografías de los geles con luz blanca por medio del BioRad Gel Documentation System (Gel Doc 1000 BioRad).

### **Experimentos *in vitro***

Los tejidos se obtuvieron de ratas que fueron decapitadas el día en que se realizaron los experimentos, se extrajo cerebro (sin cerebelo y sin tallo cerebral), hígado y riñón, los cuales al ser extraídos en seguida se colocaron en hielo. Cada uno de estos tejidos fue homogenizado con un taladro en diluciones diferentes: cerebro 1:10, hígado 1:300 y riñón 1:100 en buffer fisiológico Krebs pH 7.4 (conteniendo 19 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM glucosa, 13 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Cada uno de los homogenados de los tejidos obtenidos con anterioridad fueron incubados a 37°C durante dos horas en un baño de agua con

agitación, en presencia de 3-HK (50  $\mu\text{M}$ ),  $\text{FeSO}_4$  (5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ONOO}^-$  (25  $\mu\text{M}$ ) y una conjugación de 3-HK con cada una de las toxinas ( $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ONOO}^-$ ) e inmediatamente se llevaron a cabo tres pruebas: la cantidad de ERO, peroxidación de lípidos y la evaluación de la funcionalidad celular a través de la reducción del MTT.

### **Cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ERO)**

La determinación de ERO se estimó por medio de la detección de la fluorescencia de DCF (Ali et al., 1992; Herrera-Mundo y Sitges, 2010). Se incubaron durante 2 horas: 500  $\mu\text{L}$  de los tejidos con los diferentes tratamientos, al cual se le adicionó buffer fisiológico Krebs pH7.4 para completar el volumen final (1400  $\mu\text{L}$ ). A las muestras se les adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de DCF-DA (75  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Al final se centrifugaron a 1,789 x g por 10 minutos, la detección de ERO extracelulares se midieron en los sobrenadantes por medio de espectrofotometría de fluorescencia en un espectrómetro Perkin-Elmer a 448 nm longitud de excitación y 532 nm de longitud de emisión.

### **Determinación de peroxidación de lípidos**

La peroxidación de lípidos (PL) se evaluó por medio de la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Se incubó 250  $\mu\text{L}$  de tejido con los diferentes tratamientos al cual se les adicionó buffer fisiológico Krebs pH 7.4 para completar el volumen de 1000  $\mu\text{L}$  durante 2 horas y finalmente se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de TBA (conteniendo 0.75 g de ácido tiobarbitúrico +15 g de TCA +2.54 mL de HCl). Esta combinación fue puesta en un baño a ebullición a 94 °C durante 15 minutos, al término se colocaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron las muestras a 3,000 x g durante 5 min, se obtuvo la densidad óptica del sobrenadante en un espectrofotómetro Genesys 8 a una longitud de onda de 532 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de lipoperoxidación respecto al control, el cual se tomó como el 100 %.

### **Estimación de funcionalidad celular**

La evaluación de la funcionalidad celular se realizó por medio de la reducción de MTT, se incubaron 200  $\mu\text{L}$  de los homogenados en presencia de los diferentes tratamientos a 37°C durante 2 h, al finalizar la incubación se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) y se incubaron a

37°C durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 4,000 x g durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se le agregaron 500 µL de isopropanol ácido al botón para resuspender. Se obtuvo la densidad óptica en un espectrofotómetro Genesys 8 a la longitud óptica de 570 nm, los resultados se expresaron como porcentaje, tomando el control como el 100 %.

### **Experimentos *in vivo***

Se utilizaron ratas macho Wistar (250-300 g). Se formaron 4 grupos diferentes: Control (solución salina), 5 nmol, 10 nmol y 50 nmol, de acuerdo a reportes previos (Guidetti y Schwarcz, 1999). Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital en administración intraperitoneal (50 mg/kg) y se les realizó una lesión unilateral en el cuerpo estriado derecho (anteroposterior: 0.5 mm; Lateral: 3.0 mm de Bregma y ventral: 4.6 mm de la duramadre), posteriormente se les infundió 1 µl/min de cada una de las dosis a evaluar, 5 días después de la lesión se les realizó la prueba conductual así como las determinaciones bioquímicas.

### **Experimentos de conducta**

Cinco días después de haber realizado la cirugía a las ratas se les evaluó la asimetría motora mediante la prueba de conducta de giro inducida por apomorfina. Se les administró apomorfina (1 mg/kg) vía subcutánea y se colocó a cada rata por separado en cajas de acrílico, 5 minutos después de la administración se hizo el conteo de los giros dados y la dirección de éstos durante media hora. Esta prueba se basa en medir de manera indirecta si existe muerte o daño celular.

Para evidenciar el daño celular en el hemisferio del cerebro evocado por alguna lesión o toxina, se administra al animal con agonistas dopaminérgicos (apomorfina, anfetaminas, etc.), las cuales son encargadas de la actividad motora. Por lo tanto, cuando se administra el agonista (en este caso apomorfina) y existe un daño en las células dopaminérgicas pertenecientes al hemisferio lesionado por parte del metabolito, la rata gira del lado contrario a la lesión (giros contralaterales), esto debido a que el agonista actúa sobre el sistema dopaminérgico. El desbalance de las células de ambos hemisferios que participan en la actividad motora es la causa de la presencia de una conducta de giro en las ratas.

## **Bioquímica**

Se realizaron pruebas bioquímicas a cada grupo de ratas: control (solución salina), 5 nmol, 10 nmol y 50 nmol. Se les extrajo el estriado lesionado, se homogenizó en buffer Krebs pH 7.4 y a cada uno de los estriados se les realizó tres pruebas: peroxidación de lípidos, ERO, y funcionalidad celular.

## **Evaluación histológica**

Para realizar la evaluación histológica fue necesario perfundir a los animales previamente lesionados en el estriado. Cada rata fue anestesiada con pentobarbital (50 mg/kg) administrada intraperitonealmente, las que posteriormente fueron perfundidas y fijadas por la técnica de perfusión intracardiaca con 100 mL de solución salina isotónica al 0.9 % para que posteriormente se les infundiera 150 mL de formaldeído al 4 % preparado en un buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4. Se extrajo el cerebro y se mantuvo en formaldehído al 4 % preparado en PBS durante 48 a 72 horas. Después se hizo un proceso de deshidratación e inclusión en parafina. A partir de estos bloques de parafina se obtuvieron cortes de 8-10  $\mu\text{m}$  de espesor a nivel de estriado derecho con ayuda de un micrótopo. A cada uno de los cortes se les realizó una tinción Kluver-Barrera. Tres cortes representativos de cada estriado de cada individuo de cada grupo se observaron bajo microscopía de luz a un aumento de 40x y fueron considerados para el conteo celular final. Para diferenciar las neuronas degeneradas de las sanas se utilizaron como criterios de morfología celular como: cambios nucleares y pérdida de la morfología neuronal.

## **Estadística**

Todos los valores están expresados como valores promedio  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.) y se analizaron con una prueba de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey utilizando el programa Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los valores  $p < 0.05$  se consideraron como significativos.

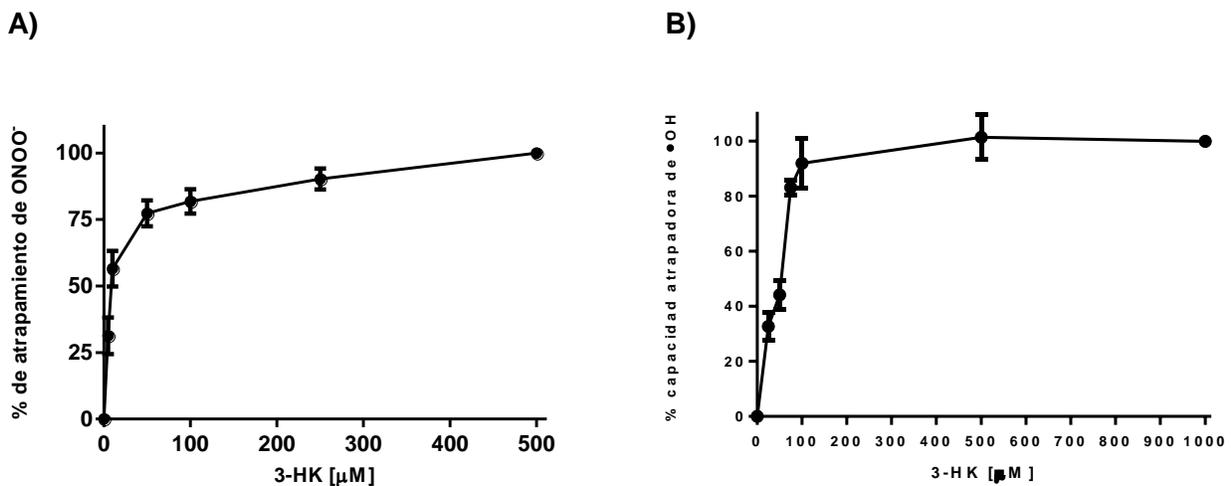
Los valores de los experimentos de ERO, peroxidación de lípidos y funcionalidad celular se expresan en porcentaje, tomando el control como un 100 %.

## Resultados

### Experimentos de química combinatoria

#### Capacidad atrapadora de 3-HK

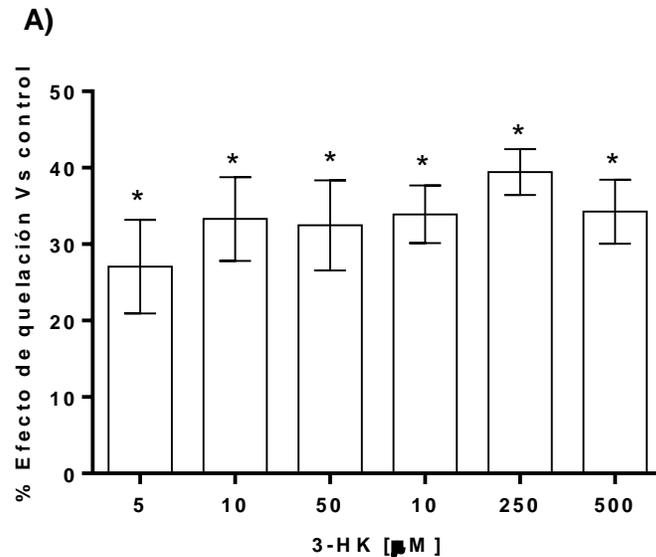
En la figura 4 se presenta la capacidad atrapadora de 3-HK, la cual se observó sólo para dos ERO: (A)  $\text{ONOO}^-$  y (B)  $\bullet\text{OH}$ , en ambos casos se observa un efecto dependiente de la concentración. Sin embargo para otras especies como  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3-HK no tuvo un efecto atrapador, datos no mostrados.



**Figura 4.** Capacidad atrapadora de 3-HK para ERO. En A se observa la capacidad atrapadora para  $\bullet\text{OH}$  donde su  $\text{IC}_{50}$  es de 50  $\mu\text{M}$ . En B se presenta la capacidad atrapadora por parte de 3-HK para  $\text{ONOO}^-$  el cual tiene un  $\text{IC}_{50}$  de 60  $\mu\text{M}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  S.E.M. de seis experimentos por concentración,  $p < 0.05$ . ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

#### Ensayo de quelación

La capacidad quelante de 3-HK se midió por medio de un método colorimétrico, en donde la formación de complejos hierro-ferrozina dan lugar a complejos coloreados, observándose que 3-HK es capaz de formar compuestos con el hierro presente en el sistema (A) en todas las concentraciones utilizadas, pero no de manera concentración-dependiente.



**Figura 5.** Capacidad quelante de 3-HK. Se presenta la capacidad de 3-HK para formar complejos con  $Fe^{2+}$ . Se toma como control el 100 % que corresponde a un sistema en presencia de EDTA. Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de seis experimentos por concentración ( $p < 0.05$ ). \*valores significativamente diferentes al control. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

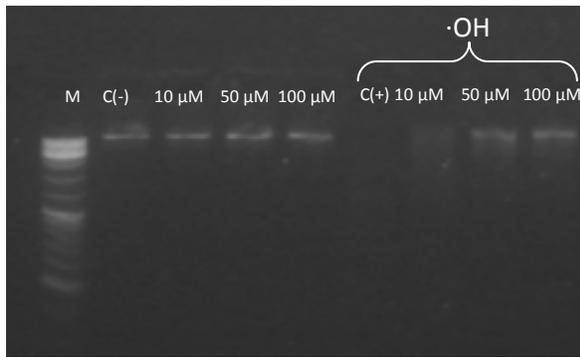
### Degradación de DNA y de proteína inducida por $\bullet OH$

El efecto de 3-HK sobre la degradación del DNA inducida por  $\bullet OH$  se presenta en la figura 6. Se observa que el DNA sometido a las diferentes concentraciones de 3-HK no es degradado comparándolo con el control negativo [C(-)]; en cambio, el DNA que se combinó con el sistema generador de  $\bullet OH$  presenta una completa degradación, la cual es prevenida por 3-HK y este efecto es concentración dependiente. En el panel B se presenta la densitometría del gel de agarosa, en el que se observa el grado de degradación del DNA.

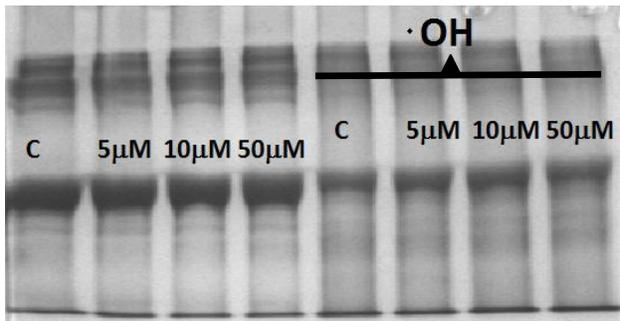
En la figura 6C y D se presenta el gel y la cuantificación de albúmina expuesta a un sistema generador de  $\bullet OH$ . Se observa que 3-HK *per se* no induce degradación de proteína, mientras que el  $\bullet OH$  la degrada. La co-incubación del sistema generador de  $\bullet OH$  con las diferentes concentraciones de 3-HK previene la degradación de albúmina.

A)

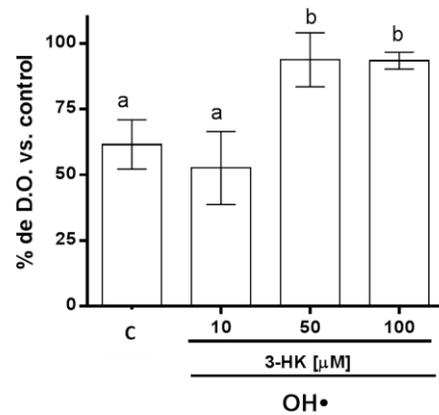
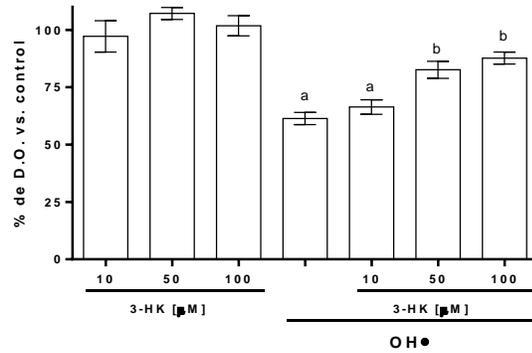
B)



C)



D)



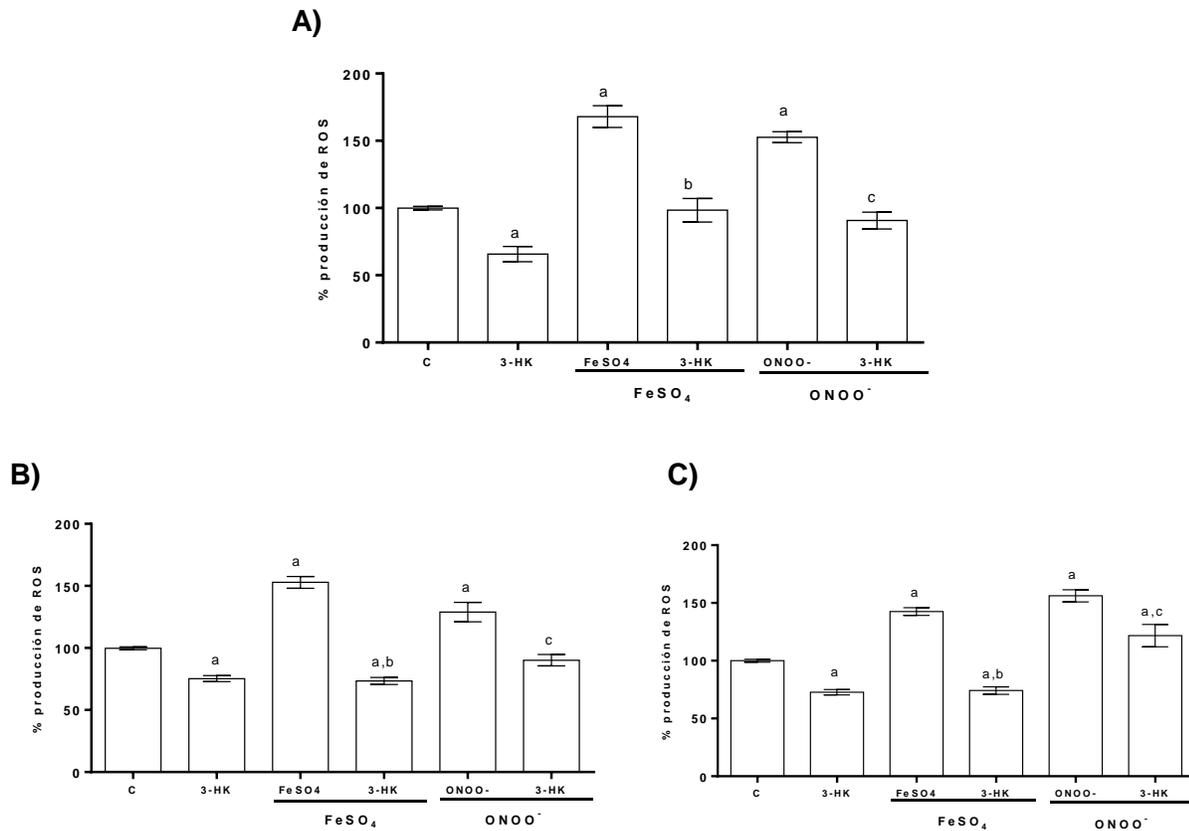
**Figura 6.** Gel de agarosa del ensayo de la degradación de DNA (A), gel de poliácridamida del ensayo de degradación de proteína (C) y densitometrías en la cual se observa el efecto protector de 3-HK hacia la degradación del (B) DNA y de (D) proteína en presencia de un sistema generador de  $\cdot\text{OH}$ . Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de cinco experimentos. <sup>b</sup> $p < 0.05$ , significativamente diferente del control. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### Experimentos *in vitro*

Resultados obtenidos de experimentos en homogenados de cerebro, hígado y riñón (con diluciones: 1:10, 1:300 y 1:100 respectivamente) con diferentes tratamientos, incubados durante 2 horas a 37°C, para poner a prueba el efecto que tiene 3-HK.

**ERO**

En la figura 7 se observa que la presencia de 3-HK en homogenados disminuye el porcentaje de ERO en un 20-30 % de manera significativa comparado con el control. Cuando los homogenados están expuestos a toxinas el porcentaje de ERO incrementa a un poco más del 50 %, pero cuando estas toxinas están en combinación con 3-HK, las ERO son abatidas (A) incluso a niveles más bajos que el control (B y C en presencia de  $\text{FeSO}_4$ ).

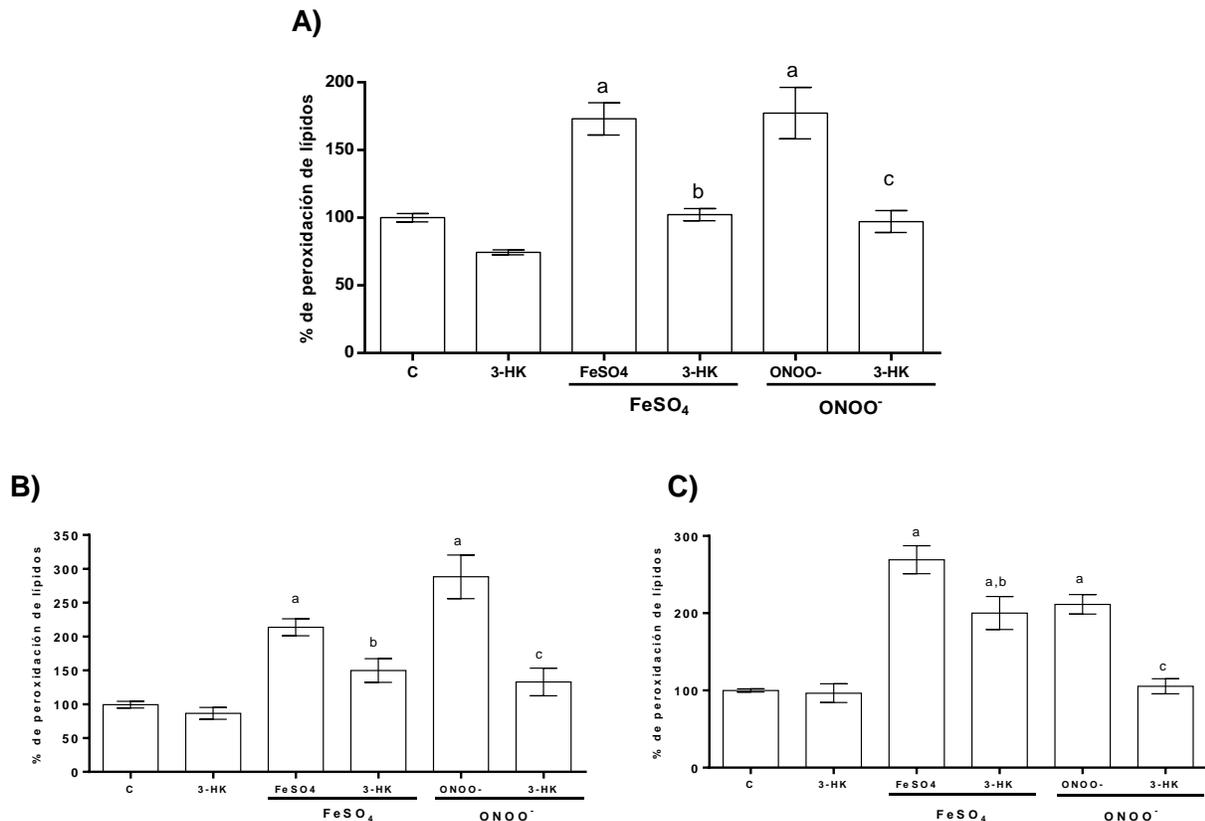


**Figura 7.** Gráficas que presentan el porcentaje de ERO en homogenados de (A) cerebro, (B) hígado y (C) riñón en presencia de 3-HK (50  $\mu\text{M}$ ) *per se* y en conjugación de toxinas como el  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ONOO}^-$ . El control se toma, en todos los casos como el 100 %. Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de seis experimentos,  $p < 0.05$ . (a) valores diferentes al control negativo, (b) valores diferentes al control positivo de  $\text{FeSO}_4$  (c) valores diferentes al control positivo de  $\text{ONOO}^-$ . ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### Peroxidación de lípidos

En la figura 8 se observa que el  $\text{FeSO}_4$  y el  $\text{ONOO}^-$  (5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente) incrementan el porcentaje de peroxidación de lípidos de manera diferencial en cada tejido en

comparación del control que es el 100 %, este porcentaje es abatido cuando las toxinas están en combinación con 3-HK; en riñón en presencia de  $\text{ONOO}^-$  y en (A) cerebro los niveles de peroxidación disminuyen a niveles del control, mientras que en (B) hígado y (C) riñón (con  $\text{FeSO}_4$ ) la disminución es significativa, pero no a niveles del control. Cabe mencionar que 3-HK por sí solo no tiene efecto alguno en la lipoperoxidación en cualquiera de los tres tejidos.

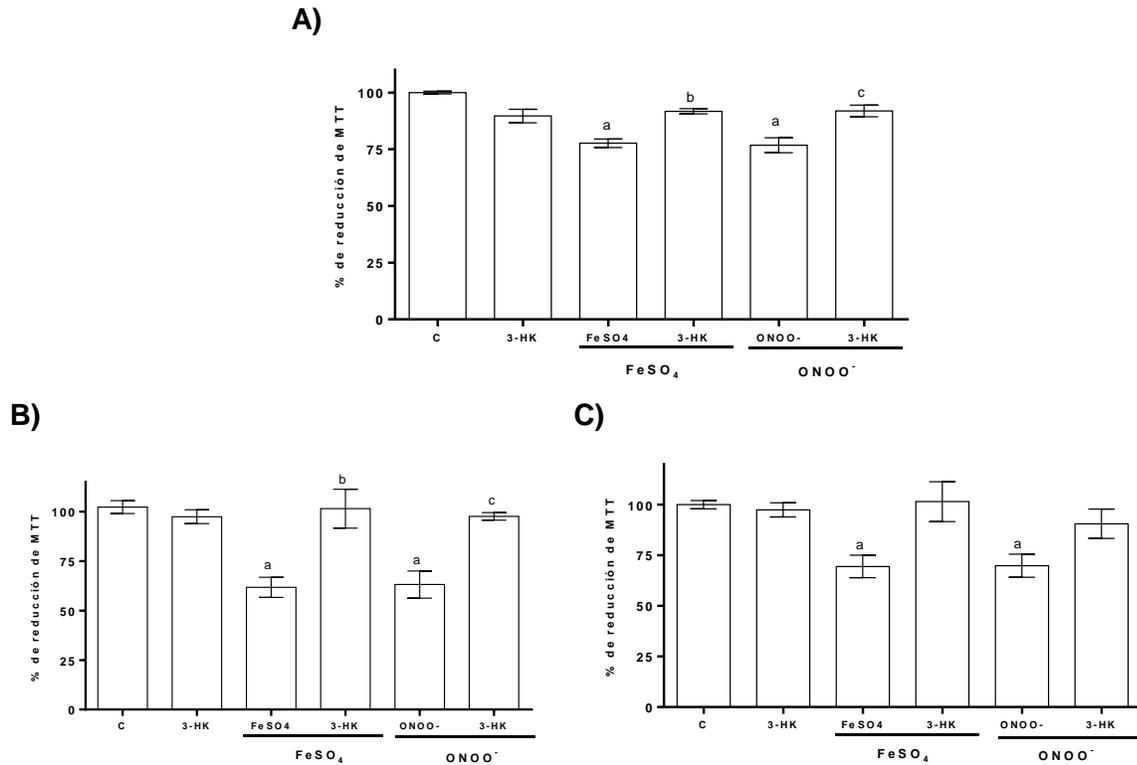


**Figura 8.** Efecto protector de 3-HK (50  $\mu\text{M}$ ) en la peroxidación de lípidos en homogenados de (A) cerebro, (B) hígado y (C) riñón en presencia de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ONOO}^-$ . El control se toma, en todos los casos como el 100 %. Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de seis experimentos,  $p < 0.05$ . (a) valores diferentes al control negativo, (b) valores diferentes al control positivo de  $\text{FeSO}_4$  (c) valores diferentes al control positivo de  $\text{ONOO}^-$ . ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### Funcionalidad celular

La funcionalidad celular en (A) cerebro se disminuyó en presencia de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ONOO}^-$  (5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente), comparada con el control (100 %), en hígado y riñón (C) la

funcionalidad disminuyó cerca de un 35-40 %. Este marcador fue recuperado por la presencia de 3-HK casi a niveles basales de manera significativa (excepto en hígado), cabe mencionar que 3-HK por sí sólo no tiene efecto alguno en la funcionalidad celular en ninguno de los tres tejidos.



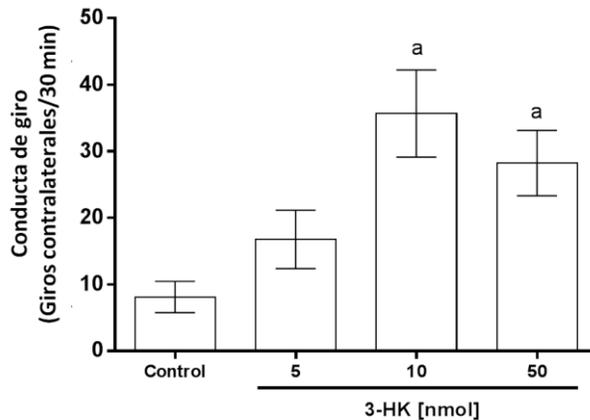
**Figura 9.** Gráficas que presentan el porcentaje de reducción de MTT en homogenados de (A) cerebro, (B) hígado y (C) riñón en presencia de FeSO<sub>4</sub> y ONOO<sup>-</sup>. El control se toma, en todos los casos como el 100 %. Se presenta la media ± S.E.M. de seis experimentos, p < 0.05. (a) valores diferentes al control negativo, (b) valores diferentes al control positivo de FeSO<sub>4</sub> (c) valores diferentes al control positivo de ONOO<sup>-</sup>. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### Experimentos *in vivo*

Estos resultados son obtenidos de ratas lesionadas en el estriado cinco días post-lesión con concentraciones de nanomoles de 3-HK.

## Conducta de giro

En la figura 10 se presenta el número de giros dados cinco días después de la cirugía por las ratas lesionadas por 3-HK en el estriado, se ve un aumento en el número de giros dados pero no de manera dosis-dependiente, se observa un aumento en el número de giros de manera significativa con las concentraciones 10 nmol y 50 nmol.

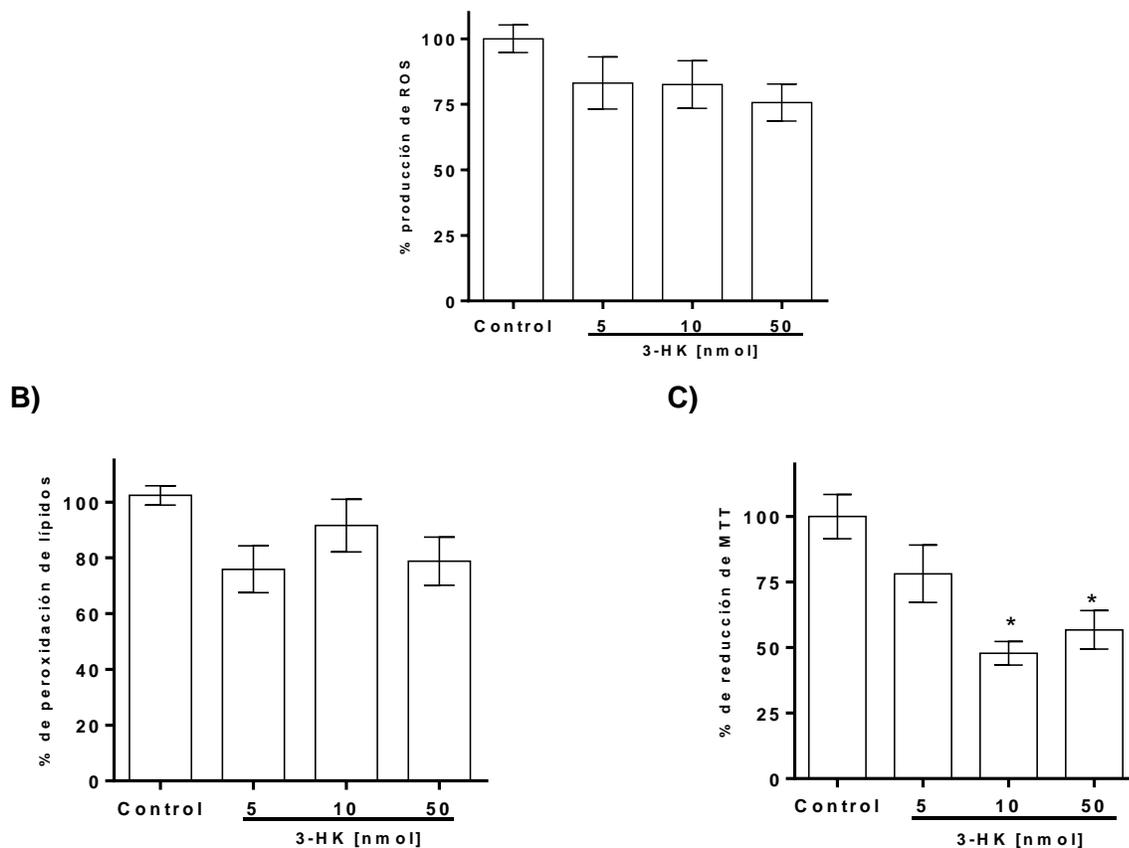


**Figura 10.** Número de giros dados por cada grupo de ratas lesionadas en el estriado con 3-HK (5 nmol, 10 nmol y 50 nmol). Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de seis animales para el grupo control, siete para 10 nmol y ocho para 5 nmol y 50 nmol. <sup>a</sup> $p < 0.05$  significativamente diferente del control. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

## Bioquímica

En la figura 11 se presentan las pruebas bioquímicas realizadas a los estriados de las ratas lesionadas con 3-HK. En el porcentaje de ERO se observa una tendencia a la disminución de estas de una manera concentración-dependiente pero no son significativamente diferentes. En el caso de la peroxidación de lípidos se ve una disminución pero de igual manera no es significativa. En cambio, en la prueba de la funcionalidad celular, ésta se vio disminuida de manera significativa comparado con el control en las concentraciones de 10 nmol y 50 nmol.

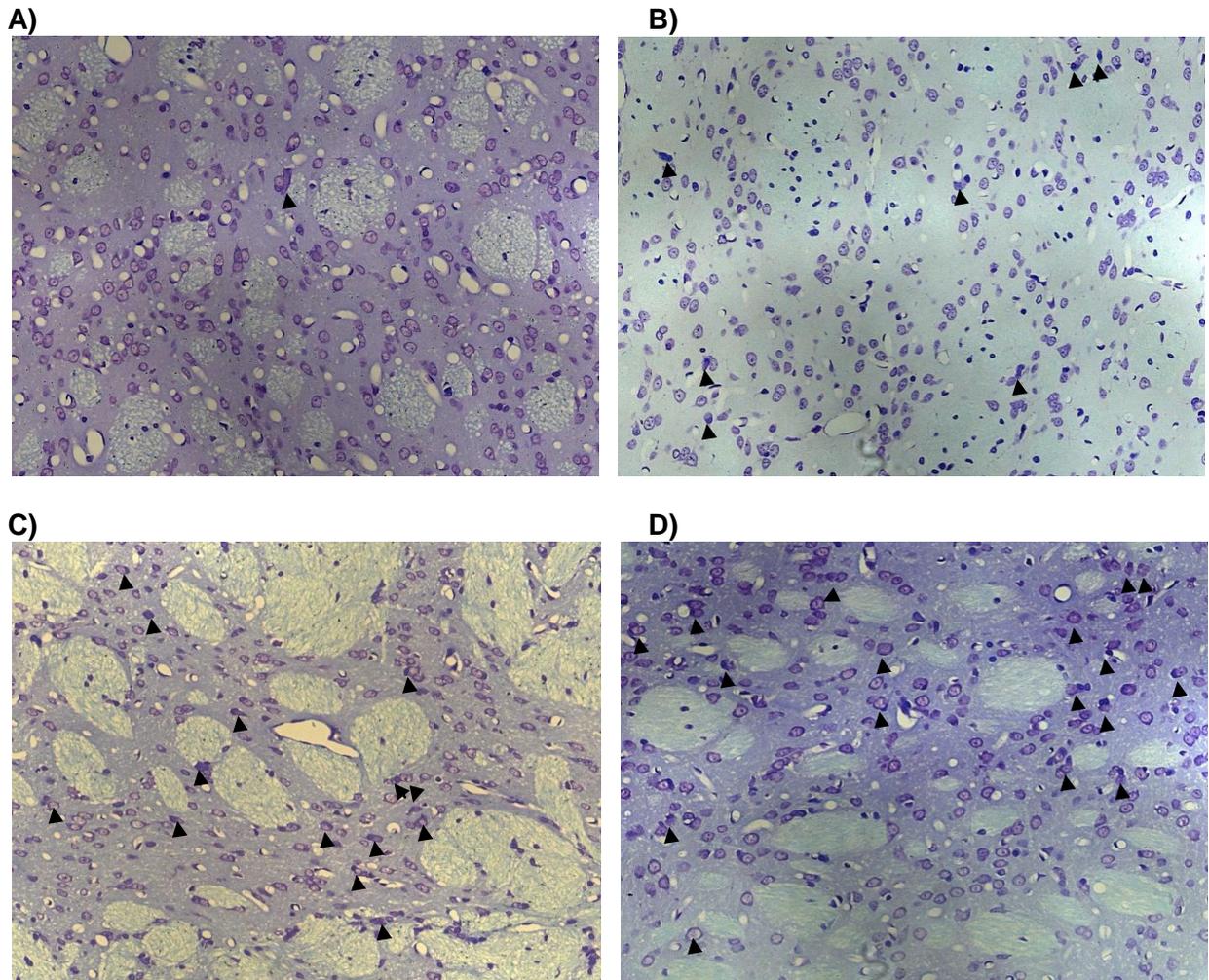
**A)**



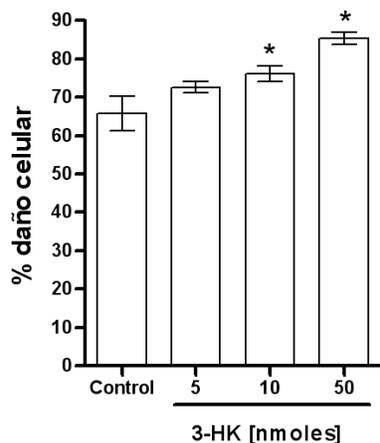
**Figura 11.** Gráficas de experimentos bioquímicos realizados a estriados de ratas lesionadas con 3-HK (5 nmol, 10 nmol y 50 nmol): (A) ERO, (B) peroxidación de lípidos y (C) funcionalidad celular. En todos los casos se toma el control como el 100 %. Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos por grupo. \* $p < 0.05$  significativamente diferentes al control. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

### Evaluación histológica

En la figura 12 se presentan las fotografías de los estriados lesionados con 3-HK y teñidos con Kluver-Barrera (A-D). Se hizo un conteo celular en donde los criterios morfológicos para el conteo de neuronas degeneradas fueron cambios nucleares como la picnosis, cariorexis y cariólisis y pérdida de la morfología neuronal (Carrillo et al., 2010). Se observa que el número de neuronas degeneradas, de acuerdo a los criterios morfológicos, incrementa respecto al control, sólo para las concentraciones 10 nmol y 50 nmol (Figura 13).



**Figura 12.** Cortes histológicos representativos de estriado en un aumento de 40x de los grupos: (A) control, (B) 3-HK (5 nmol), (C) 3-HK (10 nmol) y (D) 3-HK (50 nmol). Todos los cortes se tiñeron con Kluver-Barrera. Las flechas señalan neuronas degeneradas.



**Figura 13.** Gráfica que presenta el análisis cuantitativo de los cortes de estriado que fueron lesionados con 3-HK (5 nmol, 10 nmol y 50 nmol). El análisis se basó en criterios morfológicos como cambios nucleares y pérdida de la morfología neuronal. Se presenta la media  $\pm$  S.E.M. de tres animales por grupo. \* $p < 0.05$  significativamente diferentes al control. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

## Discusión

La 3-HK es un metabolito de la VK que se forma a partir de la L-kinurenina por medio de la enzima kinurenina 3-hidroxilasa y por su mayor afinidad de ésta por el sustrato se piensa que, la mayor parte de L-kinurenina se va a la formación de 3-HK.

Esta kinurenina es un metabolito controversial ya que existen estudios del comportamiento de éste en diferentes condiciones fisiológicas y experimentales. En este trabajo hemos puesto a prueba el comportamiento de 3-HK bajo diferentes condiciones, una de las primeras fue observar si 3-HK era capaz de funcionar como un atrapador de ERO, resultando ser un buen atrapador para  $\text{ONOO}^-$  y  $\bullet\text{OH}$ , así como un buen agente quelante. Teniendo en cuenta estas propiedades de atrapador así como de quelante, 3-HK fue capaz de atenuar la degradación de DNA y proteína. La capacidad atrapadora así como la quelante observada en este trabajo se puede explicar mediante estudios electroquímicos en donde se comprobó que 3-HK tiene los picos más altos de oxidación y reducción comparados con otras kinureninas y que es buen donador de electrones, lo que nos indica que puede ser tomado, en primera instancia como antioxidante (Giles et al., 2003).

Posteriormente se pusieron a prueba diferentes marcadores de daño oxidativo como la PL, la funcionalidad celular y la cantidad de ERO en homogenados de cerebro, hígado y riñón;

en caso de la PL y la funcionalidad celular, 3-HK *per se* no tuvo efecto alguno respecto al control pero si disminuyó las ERO. Los pro-oxidantes causaron un aumento en la PL de 150 a 300 % con respecto al control en los diferentes tejidos empleados, el cual fue abatido cuando se pusieron en presencia de 3-HK. De igual manera en la producción de ERO, los pro-oxidantes tuvieron un aumento significativo de alrededor del 50 %, pero en conjugación con 3-HK las ERO disminuyeron a niveles del control o incluso menos (3-HK+FeSO<sub>4</sub>). Para la funcionalidad celular, los pro-oxidantes produjeron una disminución de ésta de hasta un 30 %, 3-HK tuvo la capacidad de recuperar esta funcionalidad a niveles del control. Los resultados arrojados en estos experimentos nos comprueban el efecto que 3-HK tuvo en sistemas sintéticos: atrapador de ONOO<sup>-</sup> y •OH, ya que los niveles recuperados de la funcionalidad, así como la disminución de PL y ERO provocada por los pro-oxidantes fue abatida por la presencia de 3-HK.

Para los experimentos *in vivo*, contrario a lo que se esperaba, arrojaron resultados diferentes a los obtenidos en los ensayos *in vitro*, ya que después de la inyección intraestriatal que se les practicó a las ratas, éstas mostraron conducta de giro, lo cual puede deberse posiblemente a la muerte de neuronas dopaminérgicas (Spiridon y Tsironis, 2006). Este efecto correlacionó con el cambio observado en el ensayo de MTT, en el cual existe una disminución en la funcionalidad celular de casi el 50 % por parte de las concentraciones de 10 nmol y 50 nmol. Estas alteraciones fueron corroboradas al realizar tinciones Kluver-Barrera donde se contaron el número de células sanas y de las degeneradas, basándose en parámetros histológicos como la forma y características nucleares, este marcador mostró que efectivamente había presencia de muerte neuronal con una diferencia con el control.

*In vivo*, la 3-HK induce una marcada muerte neuronal, esto podría ser por el mecanismo de producción de especies reactivas como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a causa de su autooxidación, aquí demostramos que 3-HK no tuvo un efecto atrapador hacia el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (datos no mostrados); Braydi y su grupo (2009) demostraron que 3-HK es capaz de disminuir los niveles de NAD<sup>+</sup> y mediante la enzima lactato deshidrogenasa que promueve la muerte neuronal y de astrocitos, lo que podría explicar los resultados de estos experimentos. Además de que Giles y su equipo (2003) concluyen que a pesar de sus estudios electroquímicos donde demuestran la facilidad de donar electrones por parte de 3-HK, su comportamiento en estudios *in vivo* dependerá de los agentes redox y el ambiente químico en donde se encuentren. Vázquez (2001) realiza experimentos donde varía el pH y la temperatura y mide la auto-oxidación de 3-HK, encuentra grandes diferencias entre la autooxidación a pH 6 y a pH 8, lo que corrobora que el ambiente químico es una característica vital para el comportamiento de 3-HK. Entonces, de acuerdo a estas evidencias y tomando en cuenta que las concentraciones utilizadas para los estudios *in vitro* e

*in vivo* no fueron las mismas (debido a que las concentraciones reportadas en estudios previos difieren), se pueden explicar las diferencias en el comportamiento de 3-HK y de los efectos que tiene, además de que el ambiente químico en los tres tipos de experimentos (química combinatoria, experimentos *in vitro* y experimentos *in vivo*) no es el mismo. Por ejemplo, se debe tomar en cuenta que en los experimentos *in vivo*, existen factores como el metabolismo del estriado y la cantidad elevada de metales en éste, que pueden hacer la diferencia en la interacción de 3-HK con diversos componentes, ya que por sus grupos funcionales podría interactuar con alguno de ellos formando así, compuestos tóxicos para la célula o bien, que el ambiente al ser diferente promueva su carácter pro-oxidante o desencadene otros mecanismos aún no descritos para esta kinurenina.

## Conclusiones

Con los resultados anteriores podemos concluir que:

- La 3-HK es capaz de atrapar  $\text{ONOO}^-$  y  $\bullet\text{OH}$  en sistemas sintéticos.
- La 3-HK tiene la capacidad de formar complejos con el hierro en sistemas sintéticos.
- La 3-HK es capaz de atenuar la degradación de DNA y proteína en un sistema generador de  $\bullet\text{OH}$ .
- La 3-HK previene la producción de ERO y PL y recupera la funcionalidad celular en homogenados de cerebro, hígado y riñón.
- La 3-HK produce alteración en la conducta de giro cuando se administra intra-estriatalmente.
- La 3-HK *in vivo*, disminuye la funcionalidad celular en estriado, provocando cambios morfológicos celulares.
- La 3-HK genera daño celular en estriado.
- Estos datos sugieren que el comportamiento de 3-HK depende de las condiciones en donde se evalúe, esto es evidenciado en los resultados diferenciales obtenidos de los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

## Perspectivas

La 3-HK es un metabolito con un comportamiento dependiente del ambiente químico, es por eso que es de vital importancia, explorar su comportamiento en diferentes condiciones de pH y temperatura. Además de investigar más a fondo el comportamiento de 3-HK, tomando en cuenta otras variantes como: tipo celular, interacción con vías de señalización o componentes celulares como cadena respiratoria para poner a prueba el efecto de este metabolito en el metabolismo energético [como se ha observado con otro de los metabolitos de la vía como el 3-HAA (Quagliariello et al., 1964)]. Además de caracterizar el efecto de 3-HK según diferentes regiones cerebrales para poder inferir su posible efecto fisiológico y patológico.

## Referencias

- Ali S., LeBel C., Bondy S. (1992) "Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity" *Neurotox* 13:637–48.
- Allegri, G., C. V. Costa, A. Bertazzo, M. Biasiolo and E. Ragazzi (2003). "Enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in various species of animals." *Farmacologia* 58(9): 829-836.
- Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med* 10 Suppl: S18-25.
- Beckman, J. S., J. Chen, H. Ischiropoulos and J. P. Crow (1994). "Oxidative chemistry of peroxynitrite." *Methods Enzymol* 233: 229-240.
- Bordelon, Y. M., M. F. Chesselet, D. Nelson, F. Welsh and M. Erecinska (1997). "Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum." *J Neurochem* 69(4): 1629-1639.
- Carrillo-Mora, P., L. A. Mendez-Cuesta, V. Perez-De La Cruz, T. I. Fortoul-van Der Goes and A. Santamaria (2010). "Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus." *Behav Brain Res* 210(2): 240-250.
- Coyle, J. T. and P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science* 262(5134): 689-695.
- Crow, J. P. (1997). "Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species." *Nitric Oxide* 1(2): 145-157.

- Eastman, C. L. and T. R. Guilarte (1989). "Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line." *Brain Res* 495(2): 225-231.
- Floriano-Sanchez, E., C. Villanueva, O. N. Medina-Campos, D. Rocha, D. J. Sanchez-Gonzalez, N. Cardenas-Rodriguez and J. Pedraza-Chaverri (2006). "Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs." *Free Radic Res* 40(5): 523-533.
- Fontana, M., L. Mosca and M. A. Rosei (2001). "Interaction of enkephalins with oxyradicals." *Biochem Pharmacol* 61(10): 1253-1257.
- Foster, A. C., A. Vezzani, E. D. French and R. Schwarcz (1984). "Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid." *Neurosci Lett* 48(3): 273-278.
- Galano, A., N. A. Macias-Ruvalcaba, O. N. Medina Campos and J. Pedraza-Chaverri (2010). "Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study." *J Phys Chem B* 114(19): 6625-6635.
- Giles, G. I., C. A. Collins, T. W. Stone and C. Jacob (2003). "Electrochemical and *in vitro* evaluation of the redox-properties of kynurenine species." *Biochem Biophys Res Commun* 300(3): 719-724.
- Goldstein, L. E., M. C. Leopold, X. Huang, C. S. Atwood, A. J. Saunders, M. Hartshorn, J. T. Lim, K. Y. Faget, J. A. Muffat, R. C. Scarpa, L. T. Chylack, Jr., E. F. Bowden, R. E. Tanzi and A. I. Bush (2000). "3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction." *Biochemistry* 39(24): 7266-7275.
- Goshima, N., A. Wadano and K. Miura (1986). "3-Hydroxykynurenine as  $O_2^{\cdot-}$  scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*." *Biochem Biophys Res Commun* 139(2): 666-672.
- Guilarte, T. R. and C. L. Eastman (1993). "Is 3-hydroxykynurenine an endogenous neurotoxin in Huntington's disease?" *J Neurol Sci* 116(2): 227-228.
- Guidetti, P., R. Schwarcz (1999) . "3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the rat striatum". *European J. of Neuro.* 11: 3857-3863.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge and O. I. Aruoma (1987). "The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals." *Anal Biochem* 165(1): 215-219.
- Herrera-Mundo, N. and M. Sitges (2010). "Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid." *J Neurochem* 114(2): 597-605.

- Kocha, T., M. Yamaguchi, H. Ohtaki, T. Fukuda and T. Aoyagi (1997). "Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin." *Biochim Biophys Acta* 1337(2): 319-326.
- Konitsiotis, S. and C. Tsironis (2006). "Levodopa-induced dyskinesia and rotational behavior in hemiparkinsonian rats: independent features or components of the same phenomenon?" *Behav Brain Res* 170(2): 337-341.
- Lapin, I.P. (1980). "Experimental studies on kynurenine as neuroactive tryptophan gmetabolites: past, present and future" *Trends Pharmacol Sci* 370(1): 410–413.
- Leipnitz, G., C. Schumacher, K. B. Dalcin, K. Scussiato, A. Solano, C. Funchal, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, C. M. Wannmacher, A. Latini and M. Wajner (2007). "*In vitro* evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain." *Neurochem Int* 50(1): 83-94.
- Long, L. H., P. J. Evans and B. Halliwell (1999). "Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation." *Biochem Biophys Res Commun* 262(3): 605-609.
- Lugo-Huitron, R., T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muniz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverri, D. Silva-Adaya, P. D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzon, E. Ortiz-Islas, T. Lopez, E. Garcia, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaria and V. P. La Cruz (2011). "On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress." *Neurotoxicol Teratol* 33(5): 538-547.
- Moroni, F. (1999). "Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites." *Eur J Pharmacol* 375(1-3): 87-100.
- Moroni, F., G. Lombardi, G. Moneti and C. Aldinio (1984). "The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process." *Neurosci Lett* 47(1): 51-55.
- Nakagami, Y., H. Saito and H. Katsuki (1996). "3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum *in vivo*." *Jpn J Pharmacol* 71(2): 183-186.
- Okuda, S., N. Nishiyama, H. Saito and H. Katsuki (1996). "Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12553-12558.
- Okuda, S., N. Nishiyama, H. Saito and H. Katsuki (1998). "3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity." *J Neurochem* 70(1): 299-307.

- Okuno, E. and R. Kido (1991). "Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues." *Adv Exp Med Biol* 294: 167-176.
- Okuno, E., M. Nakamura and R. Schwarcz (1991). "Two kynurenine aminotransferases in human brain." *Brain Res* 542(2): 307-312.
- Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1992). "Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease." *Neurosci Lett* 144(1-2): 199-201.
- Perez-De La Cruz, V., M. Konigsberg, J. Pedraza-Chaverri, N. Herrera-Mundo, M. Diaz-Munoz, J. Moran, T. Fortoul-van der Goes, A. Rondan-Zarate, P. D. Maldonado, S. F. Ali and A. Santamaria (2008). "Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic /energetic deficit synergic model in rats." *Eur J Neurosci* 27(5): 1075-1085.
- Perez-De La Cruz, V., M. Konigsberg and A. Santamaria (2007). "Kynurenine pathway and disease: an overview." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(6): 398-410.
- Quagliariello, E., S. Papa, G. Budillon and C. Saccone (1962). "[Action of 3-hydroxyanthranilic acid on respiration and oxidative phosphorylation in liver mitochondria of pigeons]." *Boll Soc Ital Biol Sper* 38: 1349-1350.
- Quagliariello, E., S. Papa, G. Budillon and C. Saccone (1964). "Effect of 3-hydroxyanthranilic on a mitochondrial respiratory system." *Bioch J.* 91 (137): 137-146.
- Quagliariello, E., S. Papa, C. Saccone and A. Alifano (1964). "Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on the mitochondrial respiratory system." *Biochem J* 91(1): 137-146.
- Saito, K., D. H. Jin, T. Ogawa, K. Muramoto, E. Hatakeyama, T. Yasuhara and K. Nokihara (2003). "Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry." *J Agric Food Chem* 51(12): 3668-3674.
- Selva, R., C. G. Ríos, N. G. Crisostomo, E. F. Garcidueñas, D. F. Briseño, L. Navarro and E. R. Martínez (2011). "Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease, Neurodegenerative Diseases" - Processes, Prevention, Protection and Monitoring, Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed.), ISBN: 978-953-307-485-6, InTech, DOI: 10.5772/28857. Available from: <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases-processes-prevention-protection-and-monitoring/oxidative-stress-and-neurodegenerative-disease>.
- Shukla, V., S. K. Mishra and H. C. Pant (2011). "Oxidative stress in neurodegeneration." *Adv Pharmacol Sci* 572-634.

- Smythies, J. (1999). "The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationships in health and disease: a review-discussion." *Neurotox Res* 1(1): 27-39.
- Spiridon K. and C. Tsironis (2006). "Levodopa-induced dyskinesia and rotational behavior in hemiparkinsonian rats: Independent features or components of the same phenomenon?" *Beh Brain Res.* 170: 337-341.
- Stone, T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." *Pharmacol Rev* 45(3): 309-379.
- Stone, T. W. (2001). "Endogenous neurotoxins from tryptophan." *Toxicon* 39(1): 61-73.
- Vazquez, S. (2001). "Human lens protein modification : the role of hynurenine and 3 HK" Doctor of philosophy thesis. University of Wollongong. Dept. of chemistry.
- Viollier, E., Inglett P., Hunter K., Roychoudhury A., Van C. (2000). "The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters." *Applied Geochemistry* 15: 785-790.
- Wadano, A., Takenaka, Y., Matumoto, M. (1993). "3-Hydroxykynurenine as a radical scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*" 23(8): 915-925.
- Watanabe, Y., R. Yoshida, M. Sono and O. Hayaishi (1981). "Immunohistochemical localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in the argyrophilic cells of rabbit duodenum and thyroid gland." *J Histochem Cytochem* 29(5): 623-632.