



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**NUEVA RUTA DE FORMACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO A PARTIR DE
KINURENINA Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAFAEL LUGO HUITRÓN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2014



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.

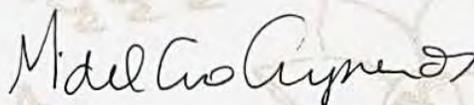
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LUGO HUITRÓN RAFAEL** con número de cuenta **302110452**, con la tesis titulada **“NUEVA RUTA DE FORMACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO A PARTIR DE KINURENINA Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ**:

Presidente: DRA. ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
Secretario: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Suplente: DRA. DINORA FABIOLA GONZÁLEZ ESQUIVEL
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de marzo de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por brindarme el apoyo para continuar con mi formación académica y otorgarme las herramientas para reforzar conocimientos y experiencias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por otorgarme la beca de posgrado para apoyar mi permanencia y conclusión de la Maestría (número de becario **262378**). Así como sustentar la realización de este trabajo con los recursos otorgados al proyecto de investigación básica con el número de registro **183867**.

Al Comitee for Aid and Education in Neurochemistry (CAEN) por otorgar los recursos para la conclusión del proyecto.

A los miembros de mi comité tutor:

- Al Dr. José Pedraza Chaverrí por sus consejos y observaciones a mi trabajo, así como las críticas al mismo que ayudaron a la óptima conclusión.
- Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por brindarme siempre su apoyo en la realización de este proyecto, asimismo por sus valiosas contribuciones para su conclusión.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Miguel Ángel García Sánchez por su gran contribución para realizar este trabajo al asesorarme y resolver las dudas que surgieron en este trayecto.

A la Dra. Verónica Pérez de la Cruz por dirigir este proyecto y transmitirme sus conocimientos para mi desarrollo durante la Maestría y por apoyarme en todo momento para su culminación.

A los integrantes del jurado por sus apreciables aportaciones a este escrito.

DEDICATORIAS

A mis padres Rafael Lugo y Ma. Teresa Huitrón porque siempre me han apoyado en mis decisiones y mis metas, por celebrar conmigo mis éxitos e incitarme a siempre llegar más alto. Me conduciré siempre con el trabajo y esfuerzo que me enseñaron y adoptaré todas sus enseñanzas, los quiero.

A mis hermanas Mari, Tere y Viri porque invariablemente me han apoyado y me han motivado para seguir en este camino. Ustedes siempre me han enseñado que el éxito no llega solo pero siempre se puede alcanzar. Sé que siempre puedo contar con ustedes y saben también que cuentan conmigo en todo momento, las quiero.

A Vero por porque siempre me has mostrado que la disciplina del trabajo no tiene que estar peleada con la amistad, me has conducido todos estos años en mis estudios y este es un fruto de nuestro trabajo que seguirá creciendo.

Dedicatoria especial

A Perla mi esposa porque eres el pilar indispensable en mi vida, gracias por acompañarme y apoyarme no sólo en este trabajo, sino en todas mis actividades, en mis metas, logros y también en mis fracasos. Este trabajo es tuyo porque sin ti no habría podido concluirlo de manera satisfactoria. Gracias por compartir tu vida conmigo y siempre mostrarme tu cariño haciendo de nuestro matrimonio la más hermosa de las aventuras. ¡Te amo Perlita!

« A la voluntad, más que a la inteligencia, se enderezan nuestros consejos, porque tenemos la convicción de que aquélla, como afirma cuerdamente Payot, es tan educable como ésta, y creemos, además que toda obra grande, en arte como en ciencia, es el resultado de una gran pasión puesta al servicio de una gran idea. »

-Santiago Ramón y Cajal, *Reglas y consejos sobre investigación científica*.

Índice de contenidos

1.	RESUMEN / ABSTRACT	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1	Vía de la kinurenina.....	3
2.1.1	Reacciones y metabolitos de la vía de la kinurenina.....	3
2.1.2	Kinurenina	6
2.1.3	Ácido kinurénico.....	8
2.2	KYNA en desórdenes neurodegenerativos.....	9
2.3	Capacidad antioxidante de KYNA.....	11
2.4	Vías de formación de KYNA.....	12
2.4.1	Los D-aminoácidos como vía de formación de KYNA.....	13
2.4.2	Las especies reactivas del oxígeno como inductoras de la formación de KYNA	14
2.5	Estrés oxidante y nitrosativo	16
2.5.1	Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....	17
2.5.2	Efectos de las ERO sobre las células.....	20
2.5.3	Daño a lípidos	21
2.5.4	Daño a proteínas	22
2.5.5	Daño a ácidos nucleicos	22
2.6	Antioxidantes en los sistemas biológicos.....	23
2.6.1	Sistemas antioxidantes no enzimáticos	24
2.6.2	Sistemas antioxidantes enzimáticos	25
3.	HIPÓTESIS.....	26
4.	OBJETIVO.....	26
4.1	Objetivos particulares	26
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1	Animales y reactivos.....	27
5.2	Determinación de la formación de KYNA en sistemas sintéticos generadores de especies reactivas	28
5.3	Análisis de KYNA por HPLC.....	29
5.4	Sistemas generadores de ERO sin muestra biológica.	29
5.4.1	Ensayo de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	29

5.4.2	Ensayo de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	30
5.4.3	Ensayo de radical hidroxilo (•OH).....	30
5.4.4	Ensayo de peroxinitrito (ONOO ⁻).....	31
5.5	Ensayos <i>in vitro</i> en homogenados de tejido y cultivos celulares.....	32
5.5.1	Preparación de homogenados de cerebro y cerebelo.....	32
5.5.2	Evaluación de la formación de KYNA y actividad de las KAT'S en homogenados de cerebro de rata.....	33
5.5.3	Evaluación de la producción de ERO por citometría de flujo.....	34
5.5.4	Determinación de la peroxidación de lípidos.....	34
5.5.5	Obtención y mantenimiento de cultivos de astrocitos primarios.....	35
5.5.6	Evaluación de la formación de KYNA y actividad de la KAT II en astrocitos.....	36
5.5.7	Evaluación de la producción de ERO en cultivos primarios de astrocitos por citometría de flujo.....	37
6.	RESULTADOS.....	38
6.1	Interacción de las ERO con L-KYN.....	38
6.2	Determinación de los factores que influyen en la formación de KYNA en sistemas libres de células.....	40
6.3	Producción de KYNA y actividad de la KAT II en homogenados de cerebro.....	43
6.4	Producción de KYNA y actividad de la KAT II en homogenados de cerebelo.....	47
6.5	L- y D-KYN previenen la formación de ERO y peroxidación de lípidos.....	51
6.6	Incremento en las concentraciones de KYNA en cultivos primarios de astrocitos.....	54
7.	DISCUSIÓN.....	57
8.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	63
9.	REFERENCIAS.....	65

ABREVIATURAS

3-Hidroxikinurenina.....	3-HK
Ácido 3-hidroxiantranílico.....	3-HA
Ácido desoxirribonucleico.....	ADN
Ácido kinurénico.....	KYNA
Ácido nordihidroguaiaretico.....	NDGA
Ácido peroxinitroso.....	ONOOH
Ácido quinolínico.....	QUIN
Ácido tiobarbitúrico.....	TBA
Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico.....	AMPA
Adenosín trifosfato.....	ATP
Amortiguador salino de fosfatos.....	PBS
Anión peroxinitrito.....	ONOO ⁻
Anión superóxido.....	O ₂ ^{•-}
Cromatografía líquida de alta resolución.....	HPLC
D-amino oxidasa.....	DAAO
Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato.....	DHCF-DA
Diclorofluoresceína.....	DCF
Dietilenetraiminapentaacético.....	DTPA
Dimetil sulfóxido.....	DMSO
D-kinurenina.....	D-KYN
Dulbecco's modified eagle's médium.....	DMEM
Especies reactivas del nitrógeno.....	ERN
Especies reactivas del oxígeno.....	ERO
Fenazina metosulfato.....	PMS
Glutati3n oxidado.....	GSSG

Glutati3n reducido.....	GSH
Indolamina dioxigenasa.....	IDO
Kinurenina aminotransferasa I.....	KATI
Kinurenina aminotransferasa II.....	KATII
Kinurenina aminotransferasa III.....	KATIII
Kinurenina.....	KYN
Kinureninas aminotransferasas.....	KATs
L-kinurenina.....	L-KYN
L-triptofano.....	L-TRP
Nicotinamida adenina dinucle3tido.....	NAD ⁺
Nitroazul de tetrazolio.....	NBT
N-metil-D-aspartato.....	NMDA
3xido n3trico.....	NO
Ox3geno singulete.....	¹ O ₂
Penicilamina.....	PEN
Per3xido de hidr3geno.....	H ₂ O ₂
Radical hidroperoxilo.....	HO ₂ •
Radical hidroxilo.....	•OH
Radical libre lip3dico.....	L•
Receptor AMPA.....	AMPAr
Receptor NMDA.....	NMDAr
Serotonina.....	5HT
Sistema Nervioso Central.....	SNC
Suero fetal bovino.....	SFB
Sulfato ferroso.....	FeSO ₄
Super3xido dismutasa.....	SOD
Triptofano dioxigenasa.....	TDO

1. RESUMEN / ABSTRACT

El ácido kinurénico (KYNA) es un antagonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (NMDAr) y alfa 7-nicotínicos para acetilcolina y se ha caracterizado como un regulador de neurotransmisión endógeno. El KYNA es producido por la transaminación de la L-kinurenina (L-KYN) evocada por las enzimas kinureninas aminotransferasas (KATs) que participan en la ruta de degradación del triptófano, denominada vía de la kinurenina. Por otro lado, se ha demostrado que el KYNA posee propiedades antioxidantes en diversos modelos de estrés oxidante. Sin embargo, se ha observado que los niveles de KYNA pueden modificarse en diversas patologías, tal es el caso de la esquizofrenia, ya que pacientes con este padecimiento presentan concentraciones muy elevadas respecto a sujetos control. A pesar de esto, no se ha demostrado que este aumento esté dado por las KATs y se han propuesto rutas alternas de formación de este metabolito en las que se incluyen, D- isómeros de aminoácidos como la D-KYN e incluso la participación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y que suceden de manera independiente a la actividad de las KATs. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la producción de KYNA a través de la interacción entre L- / D-KYN y ERO, en sistemas sintéticos de química combinatoria y modelos biológicos como tejidos homogenizados y cultivos primarios de astrocitos y establecer si esta formación de KYNA es independiente de la actividad de la KAT II. Nuestros resultados indican que de las diferentes ERO empleadas, sólo radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y anión peroxinitrito (ONOO^-) generan la formación de KYNA en presencia de L- o D-KYN en los sistemas sintéticos; sin embargo, en los homogenados de tejidos, así como en los cultivos de astrocitos sólo el ONOO^- favoreció la producción de KYNA de manera significativa independiente de la actividad de la KAT II. Con estos resultados, fue posible desarrollar la reacción que se llevaría a cabo, en la cual participan ambos isómeros de KYN y el ONOO^- , para producir KYNA.

Abstract

Kynurenic acid (KYNA) is an antagonist of NMDA receptors (NMDAR) and alpha 7-nicotinic receptors. It's has been characterized as an endogenous neurotransmitter regulator for its activity on different neurotransmitter receptors. KYNA is produced by transamination of L-kynurenine (L-KYN) evoked by the kynurenine aminotransferases (KATs), enzymes involved in the kynurenine pathway, in which tryptophan is degraded. On the other hand, it has been shown that KYNA develops antioxidant effects in different models of oxidative stress. Alterations in KYNA levels are observed in several pathologies, such as eschizofrenia, since patients with this disease present very high levels of KYNA when compared with control subjects. Despite this, remains unclear if KAT's activity is responsible for this increase, thus, alternative routes for KYNA formation have been proposed, involving D-aminoacids (such as D-KYN) and participation of reactive oxygen species (ROS), these occurring independently of KATs activity. Therefore, the aim of this work was to determinate KYNA formation through the interaction between ROS and KYN isomers (L- / D-KYN) in combinatory chemistry systems (with no biological sample), tissue homogenates and astrocytes primary cultures, and thus, stablish if KYNA production is independent of KAT II activity. Our results showed that only hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) and peroxinitrite anion (ONOO^-) induced KYNA formation in presence of both L- and D-KYN in combinatory chemistry systems (lacking of cells); however, in both homogenates and astrocytes cultures only ONOO^- showed effect increasing KYNA production significantly regardless of KAT II activity. With these results it was possible to develop the reaction steps that lead to form KYNA in an aqueous medium where both KYN isomers react with ONOO^- .

2. ANTECEDENTES

2.1 Vía de la kinurenina

2.1.1 Reacciones y metabolitos de la vía de la kinurenina.

El triptófano (TRP) es un aminoácido esencial que se obtiene de la dieta. Además de ser empleado por el organismo para la síntesis de proteínas, es el precursor para la síntesis de serotonina (5-HT), que es el principal neurotransmisor modulador de diversos procesos conductuales. Por otro lado también da lugar a la formación de melatonina, una hormona importante en diferentes procesos biológicos como los ritmos circadianos (Reiter, 1991). Sin embargo, estas vías representan sólo del 5 al 10 % del total del TRP, mientras que el 90 % restante se metaboliza por una serie de reacciones enzimáticas en cadena que en conjunto definen la vía de la kinurenina.. La vía de la kinurenina se ha identificado en todos los mamíferos, incluyendo el humano, por lo que se encuentra muy conservada evolutivamente y se sabe que la vía se lleva a cabo en hígado, riñón y en el sistema nervioso central (SNC) (Moroni, Russi, Lombardi, Beni, & Carla, 1988).

Existen diferencias menores en hígado y cerebro en la actividad de la vía; en hígado, el inicio está marcado por la ruptura del anillo indólico del L-TRP formando N-formil-kinurenina por la enzima triptófano dioxigenasa (TDO), mientras que en el cerebro, la enzima inicial es la indolamina dioxigenasa (IDO). Cabe resaltar que ésta requiere de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

para catalizar la reacción haciendo indispensables sistemas generadores de este radical, como la xantina oxidasa, mientras que puede ser inhibida por la superóxido dismutasa (SOD) (Hirata & Hayaishi, 1971) y por el óxido nítrico (NO) (Thomas, Mohr, & Stocker, 1994). Tras este paso, la formamidasa, a partir de la N-formil-kinurenina, forma L-kinurenina (L-KYN); esta reacción es esencial para el desarrollo de la vía, ya que este metabolito funge como sustrato de tres diferentes enzimas que forman otros metabolitos que tienen gran relevancia en el funcionamiento de la célula. Por un lado, la kinureninasa produce ácido antranílico, luego la kinurenina 3-hidroxisasa que forma 3-hidroxicinurenina (3-HK) y las kinureninas aminotransferasas que sintetizan ácido kinurénico (KYNA).

Cabe mencionar que en el humano se expresan tres isoformas de KAT (KAT I, KAT II y la KAT III), por lo que la producción de KYNA es compleja. Las KAT's difieren en el pH óptimo para ejercer su actividad; mientras que para la KAT I y la KAT III el pH óptimo es de ~9 (Guidetti, Okuno, & Schwarcz, 1997; Han, Robinson, Cai, Tagle, & Li, 2009), para la KAT II es a pH de 7.4, por lo que se sugiere que esta última es la principal responsable de la síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen et al., 1997).

Posteriormente la kinureninasa, a partir de 3-HK, genera ácido 3-hidroxicinurénico (3-HA), sin embargo, este metabolito también puede formarse a partir del ácido antranílico por enzimas de hidroxilación microsomal inespecíficas. El 3-HA es el precursor del ácido quinolínico (QUIN), reacción catalizada por la ácido 3-hidroxicinurénico dioxigenasa, que presenta la actividad más alta en la vía (E. Okuno, Kohler, & Schwarcz, 1987). Por último, el QUIN es metabolizado a NAD⁺ por la ácido quinolínico fosforibosil transferasa.

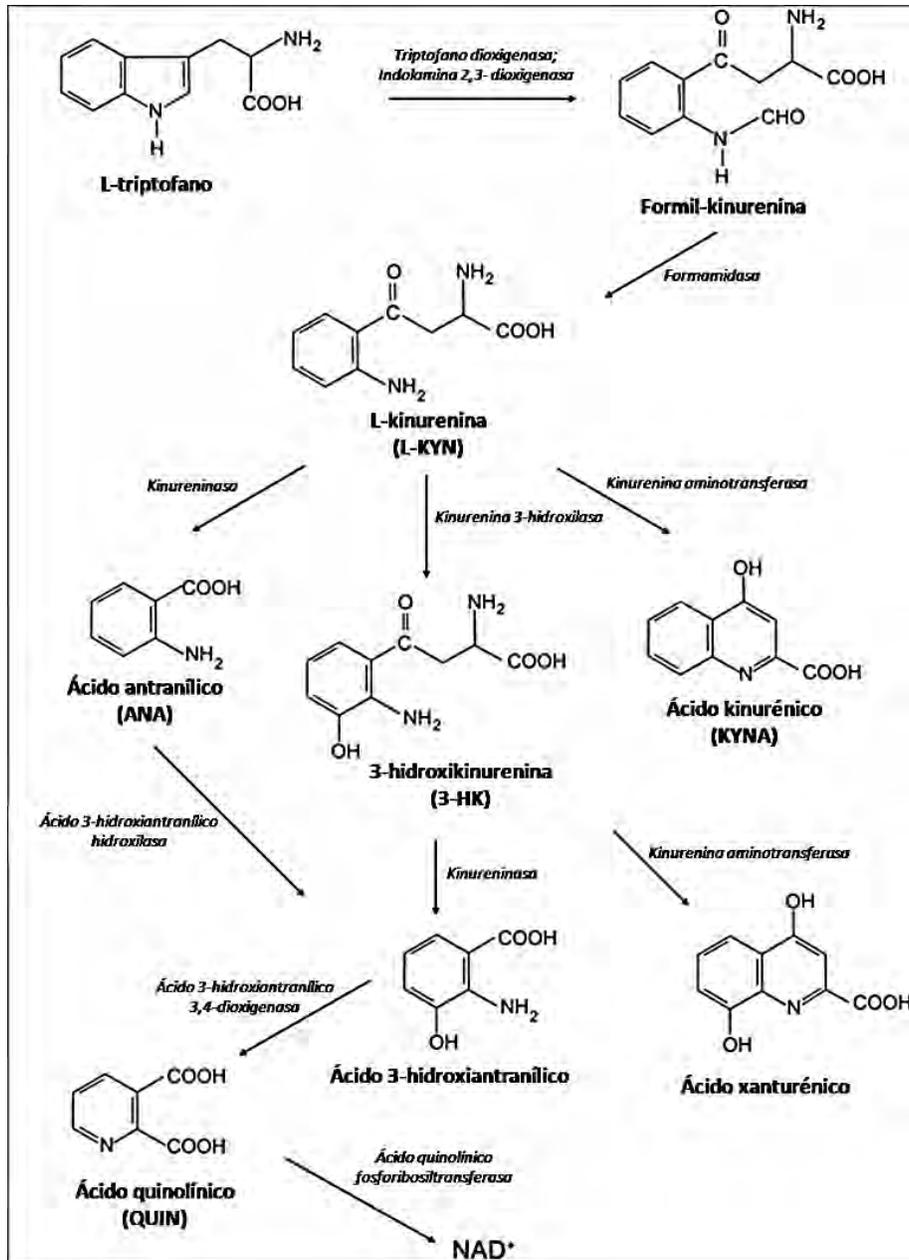


Figura 1. Vía de la kinurenina, modificado de Vamos et al, 2009 Vamos, Pardutz, Klivenyi, Toldi, and Vecsei (2009).

2.1.2 Kinurenina

La KYN es el producto de la oxidación del TRP dentro de la vía de la kinurenina, generado por la kinurenina formamidasa (Mehler & Knox, 1950), éste metabolito posee la estructura de un diamino ácido y predomina su forma catiónica (Figura 2).

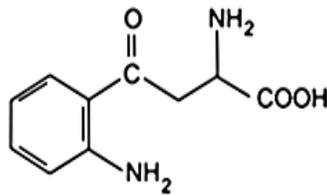


Figura 2. Estructura de la KYN

En cerebro, la L-KYN se forma principalmente en astrocitos, macrófagos y microglia (Ruddick et al., 2006). La L-KYN es capaz de atravesar membranas a través de un transportador de aminoácidos neutros (Fukui, Schwarcz, Rapoport, Takada, & Smith, 1991), y en cerebro es transportado al citoplasma de astrocitos y microglia; no obstante, puede ingresar a las neuronas pero en menor proporción debido a que este transporte es más lento y depende del suministro de Na⁺. Incluso, se estima que cerca del 60% del total de L-KYN presente en el cerebro se obtiene del torrente sanguíneo, dada la facilidad con la que es transportada a través de la barrera hematoencefálica (Smith, Momma, Aoyagi, & Rapoport, 1987). La L-KYN se encuentra en el cerebro de rata en aproximadamente el 5% de la cantidad total de triptófano y se distribuye de manera diferencial entre las diversas regiones del cerebro, por ejemplo en el cerebelo se encuentra en un rango de 0.03 pmol/mg de tejido, mientras que

en putamen alcanza 1.05 pmol/mg de tejido (Gal & Sherman, 1978; Joseph, 1978a, 1978b; Joseph, Baker, & Lawson, 1978).

No queda claro si la L-KYN ejerce algún efecto en la célula, sin embargo es de gran importancia para la vía dado que es el sustrato para diferentes enzimas que formarán otros metabolitos con acción fisiológica.. En estudios previos se ha observado que la L-KYN en diferentes modelos neurotóxicos previene el daño oxidante, sin embargo, éste efecto se adjudica a la formación de KYNA, ya que la estrategia farmacológica incluye la administración de probenecid que genera la acumulación de KYNA en el cerebro, aumentando sus concentraciones que tendrían un efecto protector ante un estímulo tóxico (Carrillo-Mora, Mendez-Cuesta, Perez-De La Cruz, Fortoul-van Der Goes, & Santamaria, 2010; Santamaria et al., 1996; Silva-Adaya et al., 2011).

No obstante, recientemente Ugalde-Muñiz (P, 2012) encontró que la L-KYN captura eficientemente especies reactivas del oxígeno (ERO) tanto en sistemas de química combinatoria (ensayos sin muestra biológica), así como en homogenados de cerebro, donde previene la peroxidación de lípidos y la formación de ERO, demostrando que este efecto es independiente a la formación de KYNA, metabolito que también se ha reportado tener propiedades antioxidantes. Esto lo evidenció al emplear ratones transgénicos que presentan niveles bajos de la KAT II y por tanto, bajas concentraciones de KYNA. Por esto, se sugiere que la L-KYN podría tener efectos adicionales en la célula y participaría directamente como antioxidante en los modelos neurotóxicos que se han descrito.

2.1.3 Ácido kinurénico

El KYNA (Figura 3) se identificó en orina canina desde 1853 (Liebig, 1853), pero no fue sino hasta 1904 (Ellinger, 1904) que se reconoció como un producto de la degradación del triptófano por la VK. El KYNA se ha estudiado ampliamente, descrito como un antagonista competitivo del sitio para glicina en receptores NMDA (NMDAr) (Parsons et al., 1997; Stone, 1993), y bloqueador no competitivo de receptores α 7-nicotínicos (Hilmas et al., 2001) por lo que se le reconoce como un agente neuroprotector endógeno. Sin embargo, la concentración necesaria para (que se produzca) el efecto de KYNA sobre NMDAr oscila en el rango de concentraciones micromolares (Stone, 1993) y dado que los niveles endógenos en el cerebro se encuentran entre 50 y 100 nM (Moroni, 1999), los receptores colinérgicos cobran gran importancia en los mecanismos de acción de KYNA, debido a que esta molécula puede antagonizar dichos receptores a concentraciones menores que las necesarias para NMDAr. Esto se demostró en experimentos con ratas, en los que se observó que la liberación de glutamato se inhibe tras la administración de KYNA (30 a 100 nM) y esta modulación es independiente de receptores glutamatérgicos, pero de manera interesante, se sugiere que los receptores colinérgicos son mediadores de dicho efecto, ya que en experimentos de microdiálisis se observó que la disminución en la liberación de glutamato evocada por KYNA no se altera en presencia de glicina, y que KYNA no mostró este efecto sobre los receptores metabotrópicos para glutamato. (Carpenedo et al., 2001). No obstante, se ha observado que el KYNA puede unirse a los receptores glutamatérgicos AMPA (AMPAr) por diferentes mecanismos concentración-dependientes, comportándose

como un modulador (excitador/inhibidor) en la señalización neuronal (Prescott, Weeks, Staley, & Partin, 2006; Rozsa, Robotka, Vecsei, & Toldi, 2008). Asimismo, se le ha atribuido un papel importante en la comunicación entre la neurotransmisión glutamatérgica, gabaérgica y dopaminérgica en el cerebro (Albuquerque & Schwarcz, 2013; Banerjee, Alkondon, & Albuquerque, 2012; Beggiato et al., 2013; Beggiato et al., 2014; A. Okuno, Fukuwatari, & Shibata, 2011).

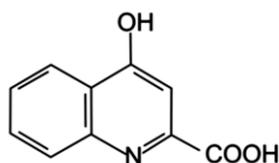


Figura 3. Estructura del KYNA

2.2 KYNA en desórdenes neurodegenerativos

Si bien el KYNA ejerce un papel muy importante a nivel fisiológico como regulador de la neurotransmisión, se puede inferir que algún desbalance en su concentración podría traer consigo modificaciones en sistemas de transmisión sináptica, desencadenando diversos mecanismos de daño celular. Por esto, se han realizado numerosos trabajos clínicos y experimentales, en los cuales se ha demostrado qué alteraciones en la vía de la kinurenina se asocian a diferentes neuropatologías.

Se ha observado que los niveles de KYNA disminuyen significativamente en líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer (Heyes et al., 1992), no obstante, Baran y col.(puedes poner "col" en todos los que citas así.), (Baran, 1999) al evaluar los niveles de KYNA en diferentes regiones de cerebros *post mortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer, encontraron un aumento en putamen y núcleo caudado de 192 y 177%, respectivamente, asociado a una mayor actividad de la KAT I en ambas regiones, mientras que la KAT II no incrementa su actividad. Dichos hallazgos sugieren que el incremento de KYNA en el putámen y núcleo caudado podría generar el bloqueo constante de los NMDAR y este efecto estaría asociado a la pérdida de memoria, aprendizaje y cognición en pacientes con esta enfermedad (Vamos et al., 2009).

Se ha mostrado que desbalances en la vía de la kinurenina están asociados con el progreso de la enfermedad de Huntington, a pesar de su carácter meramente genético. En 1992 (Schwarcz et al., 1992) se planteó la hipótesis de que el desarrollo de mecanismos de excitotoxicidad en la enfermedad de Huntington, se debe principalmente a la disminución en los factores neuroprotectores endógenos y en menor medida al aumento en los niveles de los agonistas de receptores a glutamato. Específicamente, se ha reportado que en estados tempranos de la enfermedad, los niveles de QUIN aumentan y los de KYNA permanecen constantes, pero en pacientes con la enfermedad avanzada, el QUIN se encuentra en concentraciones normales y el KYNA disminuye (Guidetti, Luthi-Carter, Augood, & Schwarcz, 2004).

Por otra parte, en la enfermedad de Parkinson, el KYNA también se encuentra disminuído en cerebros *post mortem* (Ogawa et al., 1992). Adicionalmente, se ha observado que en un

modelo de esta enfermedad, generado por MPTP (un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones), hay una disminución en las actividades de la KAT I (Knyihar-Csillik et al., 2004) y la KAT II que conlleva a una disminución de KYNA (Luchowski, Luchowska, Turski, & Urbanska, 2002). Así, se asume que el KYNA es incapaz de inhibir los NMDAr para prevenir la excitotoxicidad. (Zadori et al., 2009).

2.3 Capacidad antioxidante de KYNA

Además de la extensa participación del KYNA en el sistema nervioso central, también se ha descrito su capacidad de capturar especies reactivas de oxígeno. Goda y colaboradores, en 1996 (Goda, Kishimoto, Shimizu, Hamane, & Ueda, 1996), encontraron el primer indicio de que el KYNA posee la capacidad de atrapar $\bullet\text{OH}$ en sistemas no biológicos de producción de este radical. Posteriormente, Hardeland y Zsizsik (Hardeland, 1997) encontraron que, mediante detección por quimioluminiscencia, los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{OH}$ oxidan al KYNA y la adición de atrapadores específicos de estas especies inhibe dicha oxidación. Al darle seguimiento a estos resultados (B. H. Zsizsik, R. , 1999) y empleando un sistema de auto-oxidación de hematoxilina y la oxidación del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), los autores compararon la capacidad de captura de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{OH}$ por KYNA, 4-hidroxiquinolina, ácido quindálico, ácido xanturénico y otros metabolitos del triptófano, donde KYNA resultó ser más eficaz que la 4-hidroxiquinolina y el ácido quindálico, pero menos efectivo que el ácido xanturénico, al capturar los radicales. Los mismos autores

también demostraron que KYNA previene la degradación de 2-desoxiribosa por radicales $\bullet\text{OH}$, generados por fotólisis de la N-hidroxi-2-tiopiridona (B. H. Zsizsik, R., 1999). A pesar de que demostraron el potencial de captura de radicales libres del KYNA, su trabajo redundó un poco con lo que ya se había descrito, dado que tampoco emplearon sistemas biológicos en sus trabajos.

Aunado a lo anterior, nuestro grupo de trabajo describió las propiedades de KYNA como atrapador de ERO en modelos sintéticos y biológicos, donde abate los marcadores de daño oxidativo inducidos por diversos pro-oxidantes, indicando que su participación como agente neuroprotector no se limita al antagonismo de receptores NMDA y $\alpha 7$ -nicotínicos (Lugo-Huitron et al., 2011).

2.4 Vías de formación de KYNA

La principal ruta de formación de KYNA se da en la VK por la acción de las KAT's, teniendo como precursor la KYN, siguiendo los pasos de la vía en la degradación del triptófano. Además de las diferencias que se presentan en las concentraciones de KYNA en diferentes enfermedades, también se ha descrito que en tejido de cerebro humano, bajo condiciones fisiológicas, alcanza 1.58 pmol/mg de tejido, mientras que en rata los niveles son de 0.024 pmol/mg de tejido (Turski et al., 1988);, sin embargo, la expresión de las KAT's no cambia en ambas especies, lo que sugiere fuertemente que debe existir algún mecanismo

alternativo de formación de KYNA, el cual podría verse potenciado bajo diversas condiciones patológicas.

2.4.1 Los D-aminoácidos como vía de formación de KYNA

Se ha establecido convencionalmente que el metabolismo de aminoácidos se inclina hacia la utilización de los isómeros L- de los aminoácidos para los diversos procesos bioquímicos, mientras que los D-aminoácidos tienden a ser degradados (Albanese, Frankston, & Irby, 1945). A pesar de estos reportes, se ha demostrado que los D-aminoácidos también pueden estar presentes en diversos procesos metabólicos de mamíferos, ya que algunas proteínas que se obtienen en la dieta contienen D-aminoácidos y además pueden ser partícipes de varios procesos fisiológicos como la neurotransmisión y secreción de hormonas (Khoronenkova & Tishkov, 2008). Los primeros experimentos revelaron que al tratar rebanadas de hígado con D-triptófano, éste es metabolizado a una tasa más baja que el L-triptófano, generando la formación de L- y D-KYN y KYNA (Mason & Berg, 1952), sin embargo, no se demostró el mecanismo por el cual se daba esta producción de KYNA. En años recientes se retomaron estos experimentos y se demostró que la administración intraperitoneal de D-KYN en rata incrementó los niveles de KYNA en plasma; este efecto se atenua cuando administraban un inhibidor de la D-amino oxidasa (DAAO), lo que apuntó a la posible participación de esta enzima en los procesos de formación de KYNA inducidos por D-KYN (Fukushima, Sone, Mitsuhashi, Tomiya, & Toyo'oka, 2009). Aunado a esto, se ha

demostrado que la transaminación mediada por enzimas de la D-KYN da lugar a la producción de KYNA tanto en rata como en humano, evidenciando una posible participación de las KAT's (Perez-de la Cruz et al., 2012). En estudios complementarios, también se ha demostrado que la D-KYN incrementa los niveles de otros metabolitos de la vía que tienen alguna acción fisiológica, como la 3-HK que, junto con KYNA, aumenta sus niveles tras la administración de D-KYN en ratones (Wang, Notarangelo, Wang, & Schwarcz, 2012).

2.4.2 Las especies reactivas del oxígeno como inductoras de la formación de KYNA

Una aproximación sobre los procesos alternativos de la producción de KYNA se estudió en el dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* que al ser incubado con KYN y ser expuesto a luz (condiciones de alto estrés fisiológico por las ERO formadas) muestran un aumento en la formación de KYNA comparado al grupo tratado y no expuesto a la luz, de modo que los autores proponen un mecanismo teórico alternativo de formación de KYNA (Figura 4), en el cual se considera la participación de las ERO como un factor importante (Zsizsik & Hardeland, 2002). Sin embargo, este mecanismo no fue comprobado experimentalmente y no se realizaron trabajos posteriores hasta ahora.

Por lo anterior, es de gran relevancia investigar la participación tanto de la D-KYN como de las ERO y si la interacción que existe con ambos isómeros de la KYN puede dar lugar a la

2.5 Estrés oxidante y nitrosativo

Diversos desórdenes neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, comparten características que involucran la vulnerabilidad de las células a las diversas acciones nocivas de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN), que resultan en estrés oxidante y nitrosativo. El estrés oxidante se define como la producción de una serie de eventos tóxicos moleculares y celulares producidos por radicales derivados del oxígeno y otras moléculas reactivas, provocando un desbalance donde las especies reactivas rebasan la capacidad antioxidante de la célula. Las ERO incluyen los radicales libres - que se definen como especies reactivas que poseen un electrón desapareado en su último orbital, tales como $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$, así como las especies no radicales, como el H_2O_2 y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Estas ERO son generadas normalmente por el metabolismo redox durante la reducción incompleta del oxígeno a agua en la cadena de transporte de electrones. Por otro lado, el estrés nitrosativo o nitrérgico se refiere a una serie de eventos tóxicos producidos a nivel molecular por radicales derivados del nitrógeno y moléculas reactivas como el NO^{\bullet} y el $ONOO^-$.

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente susceptible a los efectos de las ERO/ERN debido a: 1) su elevada proporción de lípidos con respecto a otros órganos; 2) su alta tasa metabólica, ya que el metabolismo aeróbico es el principal mecanismo que provee de energía a las células neuronales, y dado que las neuronas poseen una amplia distribución de mitocondrias y que estas últimas regulan el metabolismo oxidativo y la síntesis de ATP,

el riesgo de que se produzca de manera excesiva el $O_2^{\bullet-}$ es muy alto. No obstante, en condiciones fisiológicas, los sistemas antioxidantes endógenos son capaces de neutralizar o remover estas especies reactivas; y 3) la restringida actividad de algunas enzimas antioxidantes, por ejemplo la catalasa.

2.5.1 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

Un radical libre es una especie química que puede existir de manera independiente y que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por la pérdida o por la ganancia de ellos. Estos electrones desapareados modifican la reactividad química de átomos o moléculas y las hacen más reactivas que su correspondiente “no radical”. Los radicales derivados del oxígeno (Tabla 1) son los de mayor importancia en la clínica (M & Y, 1996) por ser éste elemento la molécula más abundante en los sistemas biológicos. Las ERO son intermediarios tóxicos predominantes y son responsables del estrés oxidativo (Kehrer, 2000).

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno.

Radicales	No radicales
Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo ($\bullet OH$)	Ácido hipocloroso ($HClO$)
Radical peroxilo ($\bullet OOR$)	Ozono (O_3)
Radical hidroxiperoxilo ($\bullet OOH$)	Oxígeno singulete (1O_2)
Radical alcoxilo ($\bullet OR$)	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Peróxidos orgánicos ($ROOH$)

Las principales ERO son $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$ y se pueden formar por la reducción univalente del oxígeno (Figura 5) que se inicia por la reducción del oxígeno por un electrón que se escapa de la cadena respiratoria:

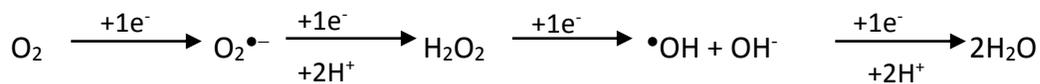
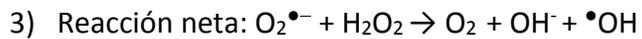
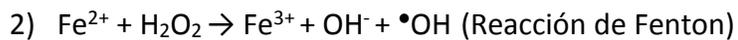
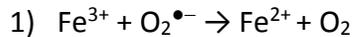


Figura 5. Generación de especies pro-oxidantes de la molécula de oxígeno.

El $\bullet\text{OH}$ es uno de los radicales más agresivos, ya que reacciona con cualquier molécula que se encuentre en las cercanías. El mecanismo principal de su generación en sistemas biológicos es la reacción de Haber-Weiss, catalizada por el hierro, hace uso de la química de Fenton (Kehrer, 2000):



Por otro lado, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es el radical primordial en la célula y su producción proviene de diversas fuentes. La principal de éstas es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en la que se pueden dar fugas de electrones en los complejos I y III. También puede generarse por el metabolismo del ácido araquidónico, el cual inicia cuando la fosfolipasa A_2 es activada por Ca^{2+} y libera el ácido araquidónico, mismo que es oxidado por la ciclo-oxigenasa por la adición de dos moléculas de O_2 , produciéndose así prostaglandina PGG_2 , la cual es instantáneamente peroxidada a PGH_2 con la liberación simultánea de $\text{O}_2^{\bullet-}$. La xantina oxidasa y la NADPH oxidasa son otras enzimas que lo producen como parte de su actividad catalítica. Alternativamente, el $\bullet\text{OH}$ puede formarse a partir de ONOO^- , ya que este se protona rápidamente al ácido peroxinitroso (ONOOH), y la descomposición espontánea de éste, genera $\bullet\text{OH}$.

El estrés nitrosativo es generado por la rápida oxidación del $\text{NO}^{\bullet}\text{NO}^{\bullet}$. El $\text{NNO}^{\bullet\bullet}$ puede reaccionar con diversas moléculas (Figura 6) y dar lugar a la generación de otra especie muy agresiva, el ONOO^{-} .

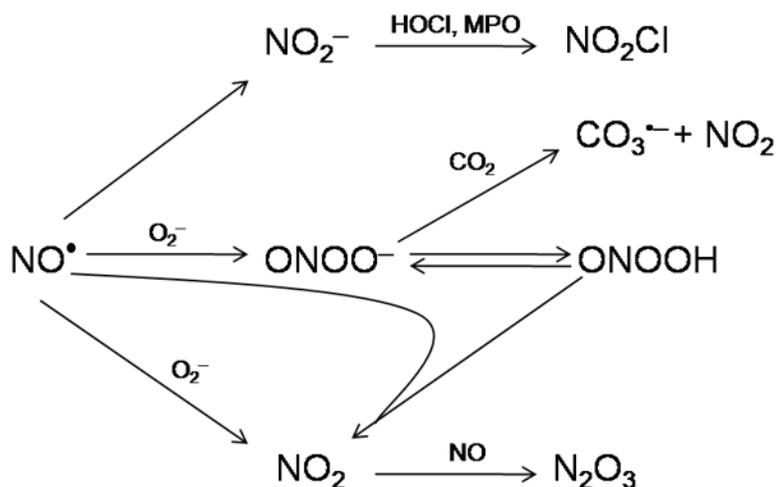


Figura 6. Vía de oxidación del $\text{NO}^{\bullet}\text{NO}^{\bullet}$ y consecuente producción de ONOO^{-} y estrés nitrosativo (Soneja, Drews, & Malinski, 2005).

2.5.2 Efectos de las ERO sobre las células

La producción de ERO ocurre de manera constante en la célula y son diversos sistemas antioxidantes los encargados de controlar dicha producción. Sin embargo, una deficiencia en estos sistemas, o bien la generación excesiva de ERO, conlleva a dañar las moléculas más importantes de los sistemas biológicos como lípidos, proteínas y ADN, afectando así su estructura y función.

2.5.3 Daño a lípidos

El sistema nervioso es notablemente susceptible al daño a lípidos dada su gran cantidad presente en membranas, específicamente los poli-insaturados. El efecto directo de las ERO sobre los lípidos es la lipoperoxidación. Los radicales $\bullet\text{OH}$ e hidroperoxilo ($\text{HO}_2\bullet$), así como el $^1\text{O}_2$, pueden reaccionar con los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidropéroxidos lipídicos (Aikens & Dix, 1991; Choe, Jackson, & Yu, 1995; Gutteridge & Halliwell, 1990; B. Halliwell & Gutteridge, 1984). La lipoperoxidación ocurre en varias fases: en la primera, la fase de iniciación, comienza cuando el radical libre secuestra un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos de la cadena carbonatada para generar un radical libre lipídico ($\text{L}\bullet$). Los ácidos grasos poli-insaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando un radical lipídico se origina, tiene inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose así un dieno conjugado que puede reaccionar con el O_2 y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poli-insaturado adyacente para formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidropéroxido. El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidropéroxido, que es un compuesto estable, entra en contacto con iones metálicos de transición y producirá más radicales libres que iniciarán y

propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y por tanto, se altera su funcionalidad (Rice-Evans & Burdon, 1993).

2.5.4 Daño a proteínas

Las ERO dañan a las proteínas, alterando tanto su estructura como su función. En el caso de las enzimas, por ejemplo, se pierde su actividad catalítica, provocando interrupciones en la transducción de señales y vías metabólicas. Los efectos de las ERO sobre las proteínas incluyen la oxidación de los residuos de aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. Ya que al parecer no existen mecanismos de reparación de proteínas, la prevención por los sistemas antioxidantes o la simple destrucción de las especies modificadas por proteólisis son mecanismos más viables (Grune, Reinheckel, & Davies, 1997). Aunque la mayoría de las proteínas oxidadas son removidas del sistema, algunas pueden acumularse gradualmente y contribuir al daño, como sucede en algunos desórdenes neurodegenerativos (Kehrer, 2000).

2.5.5 Daño a ácidos nucleicos

Las ERO dañan el ADN al reaccionar con la desoxirribosa y las bases nitrogenadas. Existen diversos sistemas de reparación del ADN, ya que estas especies presentan niveles basales

en la célula (Lindahl & Wood, 1999); no obstante, si las ERO se producen en sitios críticos o no son reparados rápidamente, puede haber consecuencias perjudiciales que van desde producir mutaciones hasta la apoptosis, la necrosis, e incluso la carcinogénesis (Klaunig et al., 1998). Uno de los efectos más sobresalientes de la presencia de ERO y que de hecho se emplea como marcador de daño oxidativo, es la fragmentación del ADN, afectando su organización al romper los nucleosomas y por tanto la condensación de la cromatina, que finalmente impedirá la transcripción de genes (Cárdenas-Rodríguez N, 2006).

La producción de ERO es controlada en la célula por diversos sistemas antioxidantes; sin embargo, este equilibrio puede perderse cuando estos sistemas presentan alguna deficiencia o cuando la generación de ERO es excesiva, lo que conlleva a daños en las moléculas.

2.6 Antioxidantes en los sistemas biológicos

Las células poseen sistemas de defensa que les permiten controlar la concentración de especies reactivas. Estos sistemas de antioxidantes se agrupan en dos tipos: no enzimáticos y enzimáticos.

2.6.1 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, que capturan radicales libres y generan especies reactivas menos nocivas para la célula. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de ceder un electrón a un radical con el fin de estabilizarlo. Los antioxidantes no enzimáticos más importantes son:

- A. Vitamina E (α -tocoferol). Es considerado el antioxidante mayormente distribuido en los seres vivos. Posee la capacidad de interrumpir la peroxidación de lípidos en la fase de propagación, reaccionando con los radicales lipoperoxilos y alcoxilos. Al interactuar con lipoperoxilos, genera el radical α -tocoferilo, el cual es transformado de vuelta a α -tocoferol por el ácido ascórbico, en el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (May, Cobb, Mendiratta, Hill, & Burk, 1998).
- B. Glutati3n (GSH/GSSG). El glutati3n reducido (GSH) es considerado una t3pica forma antioxidante al impedir la oxidaci3n de los grupos tiol (-SH) de las prote3nas; tiene la capacidad de reaccionar con las ERO, transfiriéndoles un átomo de hidrógeno (Barry Halliwell & Gutteridge, 2007).
- C. Ácido úrico. Comúnmente se le considera como un producto terminal del metabolismo de las purinas y posee propiedades antioxidantes *per se*; sin embargo, se desconoce el mecanismo específico por el cual ejerce su acci3n, pero se sugiere que previene la oxidaci3n de la vitamina C y forma complejos con los metales hierro y cobre (Yu, 1994).

2.6.2 Sistemas antioxidantes enzimáticos

Como lo denota su categoría, estos antioxidantes son enzimas encargadas de convertir las especies reactivas en menos reactivas, y entre estos destacan:

- A. Superóxido dismutasa (SOD). Es una metaloproteína cuya función es catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Esta enzima presenta tres isoformas de las cuales dos tienen como sitio activo al Cu^{2+} y Zn^{2+} , localizadas en el citosol y en el exterior de la célula, respectivamente. La tercera isoforma tiene como sitio activo al Mn^{2+} y se encuentra en la matriz mitocondrial.
- B. Catalasa. Es una hemoproteína que se encuentra principalmente en los peroxisomas y las mitocondrias; su actividad antioxidante consiste en disminuir el riesgo de la formación del OH^{\bullet} por la interacción del H_2O_2 con metales de transición vía la reacción de Fenton (Kehrer, 2000). El mecanismo por el cual lleva a cabo su función tiene lugar en dos fases: primero, hace una ruptura del H_2O_2 , generando en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de agua y después, se lleva a cabo la reacción del oxoferrilo con otras moléculas de H_2O_2 .
- C. Glutación peroxidasa. Es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. Esta enzima degrada H_2O_2 y requiere la presencia de GSH (Powers & Lennon, 1999).

D. Glutación reductasa. Esta enzima cataliza la conversión de glutación oxidado (GSSG) a GSH, requiere de NADPH y es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de esta molécula (Harris & Massey, 1997).

3. HIPÓTESIS

Si asumimos que existen rutas alternativas de formación de KYNA que involucran a las ERO's, entonces ONOO^- , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ o $\bullet\text{OH}$, podrían reaccionar con D- y L-KYN e inducir la formación de KYNA tanto en medios libres de células como en biológicos.

4. OBJETIVO

Caracterizar y cuantificar los parámetros de formación de KYNA a partir de L- y/o D-KYN al reaccionar con las especies reactivas en sistemas sintéticos y en homogenados de tejidos de rata.

4.1 Objetivos particulares

- Establecer en sistemas de química combinatoria de producción de especies reactivas (sin muestra biológica), cuáles de éstas (ONOO^- , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ o $\bullet\text{OH}$) son capaces de interactuar con D y L- KYN para la formación de KYNA.

- Caracterizar si la producción de KYNA en los medios sintéticos es dependiente del tiempo, temperatura o concentración de los sustratos.
- Cuantificar el KYNA formado en homogenados de cerebro y cerebelo de rata, así como la actividad de la KAT II, en presencia de L- y D-KYN en conjunto con ONOO^- y FeSO_4 .
- Evaluar si L- y D-KYN previenen la formación de ERO y la peroxidación de lípidos en los homogenados de cerebro y cerebelo.
- Establecer en cultivos primarios de astrocitos de rata si los niveles de KYNA se ven alterados al incubarlos con FeSO_4 o ONOO^- en presencia de L- y D-KYN.
- Evaluar si la actividad de la KAT II en los cultivos de astrocitos se altera tras la incubación con las especies reactivas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales y reactivos

Todos los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Las soluciones se prepararon usando agua desionizada obtenida de un sistema purificador Milli-Q (Millipore).

Para la obtención de homogenados se usaron ratas Wistar macho (250-300 g) y para los cultivos primarios de astrocitos se emplearon ratas Wistar de hasta 3 días después del

nacimiento. Para todos los experimentos propuestos, los animales se agruparon en 5 por cada caja de acrílico, alimentados con un producto comercial (Purina Chow) y agua *ad libitum*. Los cuartos del bioterio se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^\circ \text{C}$), humedad ($50 \pm 10 \%$), y luz (12:12 ciclo luz oscuridad).

5.2 Determinación de la formación de KYNA en sistemas sintéticos generadores de especies reactivas

Se emplearon sistemas sintéticos generadores de especies reactivas los cuales no contenían muestra biológica alguna para establecer si la interacción directa de cada especie reactiva generada con L- o D-KYN genera a su vez KYNA a través de una reacción no enzimática. La presencia de KYNA fue evaluada por HPLC. Los ensayos se realizaron bajo diferentes condiciones para caracterizar las diferencias que existieran al modificar estos factores. Se emplearon concentraciones crecientes de L- y D-KYN (1 a $50 \mu\text{M}$) incubando a temperatura ambiente, para determinar si la cantidad de KYNA formado era directamente proporcional a la concentración de los precursores. Por otro lado, la reacción se llevó a cabo a diferentes temperaturas (4, 22, 37 y 60°C), así mismo se realizó durante 1, 15, 30 y 45 min a temperatura ambiente.

5.3 Análisis de KYNA por HPLC

La presencia de KYNA en los ensayos sintéticos e *in vitro* fue evaluada por cromatografía líquida de alta resolución mediante un método de fase reversa con una fase estacionaria no polar (columna HR-80; ESA, Thermo Scientific) y una fase móvil polar que contiene acetato de zinc 250 mM, acetato de sodio 50 mM y acetonitrilo 3% en un pH final de 6.2 ajustado con ácido acético glacial. El método se lleva a cabo a un flujo de 1 ml / min de manera isocrática. El tiempo de retención de KYNA es a los 7 minutos y se detectó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 344 nm y de emisión 398 nm. Se empleó una bomba binaria LC Flexar S200, un automuestreador Flexar S200 y un detector de fluorescencia 200^a (PerkinElmer, Connecticut, USA).

5.4 Sistemas generadores de ERO sin muestra biológica.

5.4.1 Ensayo de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

La formación de $O_2^{\bullet-}$ se efectuó mediante el sistema descrito por Nikishikimi y colaboradores (Nishikimi, Appaji, & Yagi, 1972; Ponti, Dianzani, Cheeseman, & Slater, 1978). Brevemente, en un tubo de ensayo se mezclaron 10 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), amortiguador HEPES 20 mM, fenazina metosulfato (PMS) 4 μ M, nitroazul de tetrazolio (NBT) 40 μ M y diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 20 μ M) de L- ó D-KYN y se inicia la

reacción con nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) 196 μM para generar $\text{O}_2^{\bullet-}$. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones previamente mencionadas (sección 6.2) evaluando la presencia de KYNA por HPLC.

5.4.2 Ensayo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se empleó el ensayo H_2O_2 - Fe^{3+} -naranja de xilenol-FOX. En un tubo de ensayo se mezclan 10 μl de metanol absoluto, 50 μl de H_2O_2 25 μM y 50 μl de L- o D-KYN a las diferentes concentraciones. Por último, se agrega el reactivo FOX compuesto por naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM

5.4.3 Ensayo de radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

Se llevó a cabo mediante el sistema Fe^{3+} -EDTA- H_2O_2 (Floriano-Sanchez et al., 2006; B. Halliwell, Gutteridge, & Aruoma, 1987). Para el ensayo se colocaron en tubos 200 μl de ácido ascórbico 1 mM, 300 μl de amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM pH 7.4 y 200 μl de la solución EDTA 1.04 mM/ FeCl_3 1 mM y diferentes concentraciones de L- o D-KYN (1, 5, 10 y 20 μM); por último, la generación de $\bullet\text{OH}$ se da mediante la reacción de Fenton añadiendo 100 μl de H_2O_2 10 mM al ensayo. De igual manera se evaluaron las diferentes condiciones, determinando KYNA por HPLC.

Posteriormente se evaluó la capacidad de captura de $\bullet\text{OH}$ de los precursores L- y D-KYN bajo el mismo sistema Fe^{3+} -EDTA- H_2O_2 , pero agregando desoxirribosa 2.8 mM como marcador de oxidación. Las muestras se incubaron durante una hora a 37°C y se agregó 1 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA), se calentaron 10 minutos en baño maría a 100°C para posteriormente registrar las absorbencias a 532 nm en un espectrofotómetro Lambda 25, Perkin-Elmer.

5.4.4 Ensayo de peroxinitrito (ONOO^-)

El ONOO^- se sintetizó utilizando el método descrito por Floriano-Sánchez (Floriano-Sanchez et al., 2006), mezclando, en baño de hielo, 5 ml de la solución de H_2O_2 0.7 M en HCl 0.6 M con 5 ml de KNO_2 0.6 M; la reacción se detuvo casi instantáneamente con NaOH 1.2 M frío. El H_2O_2 residual se removió usando una columna de MnO_2 previamente lavada con NaOH 1.2 M durante 20 minutos. La mezcla obtenida se almacenó a -20°C por una noche, después, se descongeló la mezcla y se recolectó la capa de líquido amarillo y se mantuvo a -20°C . Previo a cada experimento, se comprobó la concentración de ONOO^- en cada alícuota por espectrofotometría a 302 nm, utilizando un coeficiente de extinción de $1.670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración empleada de ONOO^- en los sistemas sintéticos fue 5 μM , donde se adicionaron las diferentes concentraciones de L- o D-KYN, llevando a un volumen final de 300 μl con agua. Posteriormente, se evaluó la cantidad de KYNA por HPLC. Por otro lado, también se determinó la capacidad de captura de L- y D-KYN para ONOO^- , la cual se midió

a través de la inhibición de la formación de diclorofluoresceína (DCF), a partir de diclorodihidro-fluoresceína (DHCF). En el tubo 100%? se colocaron 20 μ l de ácido dietilnetriaminapentaacético (DTPA) 1 mM, 30 μ l de DHCF 1.75 mM, 0.95 ml de H₂O y 15 μ l del ONOO⁻ sintetizado. Al tubo problema se le agregaron, diferentes concentraciones de L- o D-KYN en 100 μ l. Se registraron las absorbancias, a 500 nm, cada minuto durante 3 min para obtener las pendientes y comparar contra el tubo 100%.

5.5 Ensayos *in vitro* en homogenados de tejido y cultivos celulares

5.5.1 Preparación de homogenados de cerebro y cerebelo

Para los experimentos *in vitro*, se empleó como sistema biológico los homogenados de tejido de rata, para lo cual se extrajo cerebro y cerebelo, se homogenizaron 1:20 en buffer Krebs-Ringer (NaCl 118.5 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.77 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucosa 5 mM, NaH₂PO₄ 12.9 mM y NaHPO₄ 3 mM; pH 7.4).

5.5.2 Evaluación de la formación de KYNA y actividad de las KAT'S en homogenados de cerebro de rata

Los homogenados de cerebro y cerebelo de rata 1:10 fueron incubados con FeSO_4 ($5 \mu\text{M}$) y ONOO^- ($10 \mu\text{M}$) en la presencia de D y L-KYN ($20 \mu\text{M}$), se dejaron incubar durante una hora a 37°C en un volumen final de $500 \mu\text{l}$; en paralelo, se incubaron tubos con los sustratos antes mencionados a los que se les adicionó ácido oxaloacético (AOAA) (1 mM), un inhibidor inespecífico de las KAT's y ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) ($5 \mu\text{M}$), un potente antioxidante que al capturar las ERO en el sistema prevendrá la formación de KYNA.

Transcurrida la hora de incubación se separaron $100 \mu\text{l}$ de cada muestra a los que se les adicionó $100 \mu\text{l}$ de un coctel que contiene L-KYN, P5P (piridoxal-5-fosfato) y piruvato para evaluar la actividad de las KAT's, una vez que se agregó dicho coctel a las muestras, se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C y la reacción se detuvo con la adición de 1 ml de $\text{HCl } 0.1 \text{ N}$.

Para ambos casos las muestras fueron centrifugadas a $14,000 \text{ rpm}$ y la producción de KYNA fue evaluada por cromatografía líquida de alta resolución bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 6.3 .

5.5.3 Evaluación de la producción de ERO por citometría de flujo

Para evaluar la formación de ERO por citometría de flujo se colocaron 50 μl de homogenado en un volumen final de 200 μl , en presencia o ausencia de FeSO_4 (5 μM) y ONOO^- (25 μM), con la presencia de D y L-KYN (20 μM); las muestras se incubaron durante una hora a 37°C, una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 20 μl de una solución de diacetato de diclorofluoresceína (DHCF-DA) 75 μM . La formación de ERO se detectó por fluorescencia de la DCF-DA, después de 10 minutos de incubación con la DCF-DA, se adquirieron las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton and Dickinson Biosciences) y la intensidad de fluorescencia se detectó en el canal FL-1, excitando con el láser azul (488 nm). Se adquirieron un total de 10,000 eventos para cada muestra, los datos adquiridos se analizaron con el programa FlowJo (FlowJo Enterprise) para obtener la intensidad media de fluorescencia relativa de cada muestra.

5.5.4 Determinación de la peroxidación de lípidos

La evaluación de la peroxidación de lípidos en homogenados se estimó por el método de TBA, basado en la formación de malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando productos fluorescentes (Triggs & Willmore, 1984) .Se utilizaron 500 μl de homogenado de cerebro y cerebelo de rata en un volumen final de 1,250 μl , en presencia o ausencia de FeSO_4 (5 μM) y ONOO^- (25 μM),

en la presencia de D y L-KYN (20 μ M), las muestras se incubaron durante una hora a 37°C. Después de la incubación, se agregaron 500 μ l de la solución de TBA (0.75 g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 ml de HCl, en un volumen final de 50 ml en H₂O); se calentaron los tubos en baño María a 100°C por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 3,000 x g por 15 minutos. Finalmente, se obtuvieron las absorbancias a 532 nm. Los resultados se expresan en porcentaje de peroxidación lipídica respecto al control.

5.5.5 Obtención y mantenimiento de cultivos de astrocitos primarios

Se obtuvieron cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas de 3 días de vida. Para ello, se sacrificaron las ratas y se les extrajo el cerebro descartando el cerebelo, el tejido fue disgregado y homogenizado para posteriormente mantener las células creciendo en condiciones libres de antibiótico con medio DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementadas con suero fetal bovino (SFB) (10%) (Bio West, Nuaille, France).

Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 80%, las células fueron lavadas con PBS (amortiguador salino de fosfatos), disgregadas con tripsina (Bio West, Nuaille, Francia) y sembradas en placas para cultivo celular de 24 pozos (Corning, NY, USA) Los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM, suplementado con SFB 10% antibiótico-antimicótico (Bio

West, Nuail , France), incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda controlada con CO₂ al 5%.

5.5.6 Evaluación de la formación de KYNA y actividad de la KAT II en astrocitos

Una vez que se sembraron los astrocitos en las placas de 24 pozos, a una densidad de 5x10³ células por pozo, se les retir  el medio DMEM y se les colocó HBSS (Solución salina balanceada Hank) sin Ca²⁺ y Mg⁺. Las células se trataron con FeSO₄ (5 µM), ONOO⁻ (10 µM) y en presencia de D y L-KYN (20 µM) así como AOAA (1 mM) en un volumen final de 500 µl, las placas se incubaron por un periodo de una hora a 37°C para determinar la producción de KYNA, posteriormente se lisaron las células mecánicamente para analizar la producción total de KYNA.

En paralelo, se incubaron placas con los sustratos antes mencionados a los que una vez transcurrido el tiempo de incubación, se les adicionó 100 µl de un cocktail que contiene L-KYN, P5P (piridoxal-5-fosfato) y piruvato, para evaluar la actividad de las KAT's; una vez que se agregó dicho cocktail a las células, se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de HCl 0.1 N, se lisaron las células mecánicamente y se colocaron los sobrenadantes en un tubo eppendorf.

En ambos casos las muestras se centrifugaron a 22,000 x g y la producción de KYNA se evaluó nuevamente por HPLC, de acuerdo al método descrito en la sección 6.3 .

5.5.7 Evaluación de la producción de ERO en cultivos primarios de astrocitos por citometría de flujo

Para evaluar la formación de ERO en cultivos de astrocitos por citometría de flujo, los astrocitos se sembraron en placas de 24 pozos, a una densidad de 5×10^3 células por pozo. Los células se lavaron con PBS y se cosecharon de la placa agregando tripsina (Bio West, Nuaille, France); se realizaron dos lavados con PBS, centrifugando entre cada lavado a $950 \times g$ y desechando el sobrenadante.

Las células se colocaron en tubos para citómetro en un volumen final de $200 \mu\text{l}$ de HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , en presencia o ausencia de diferentes pro-oxidantes, FeSO_4 ($5 \mu\text{M}$) y ONOO^- ($25 \mu\text{M}$), en presencia de D y L-KYN ($20 \mu\text{M}$) y se dejaron incubar durante una hora a 37°C ; una vez terminado el tiempo de incubación, se agregaron $20 \mu\text{l}$ de una solución de DHCF-DA $75 \mu\text{M}$. La formación de ROS se detectó por fluorescencia de la DHCF-DA y las células se adquirieron después de 10 minutos de incubación con la DHCF-DA: Para leer la fluorescencia de las muestras se utilizó un citómetro de flujo (BD FacsCallibur) y la intensidad de fluorescencia fue detectada en el canal FL-1, excitando con el láser azul (488nm). Se adquirieron un total de 10,000 eventos para cada muestra, los datos adquiridos se analizaron con el programa FlowJo para obtener la intensidad media de fluorescencia relativa de cada muestra.

6. RESULTADOS

6.1 Interacción de las ERO con L-KYN

Se evaluó la formación de KYNA en sistemas generadores de ERO tales como O_2^{\bullet} , $\bullet OH$, H_2O_2 , $ONOO^-$ en presencia de L- o D-KYN; Se detectó KYNA por HPLC sólo en presencia de $\bullet OH$ y $ONOO^-$, dado que no se observaron picos en el tiempo de retención de KYNA, a los 7 minutos, de acuerdo al método utilizado, lo que nos indica que sólo estas dos especies son capaces de reaccionar tanto con L- como con D-KYN en los sistemas sintéticos. Para evidenciar que el efecto se debe a la formación de ERO, se realizaron los ensayos con atrapadores específicos de $\bullet OH$ y $ONOO^-$, como son el DMSO y la penicilamina, respectivamente y se observó que la formación de KYNA disminuye en presencia de estos compuestos atrapadores de ERO. Estos resultados nos indican que la especie reactiva formada está siendo capturada parcialmente y por lo tanto no reacciona en su totalidad con la L-KYN. En la figura 7 se muestran los cromatogramas representativos de los ensayos realizados con L-KYN, demostrando la presencia de KYNA en los experimentos.

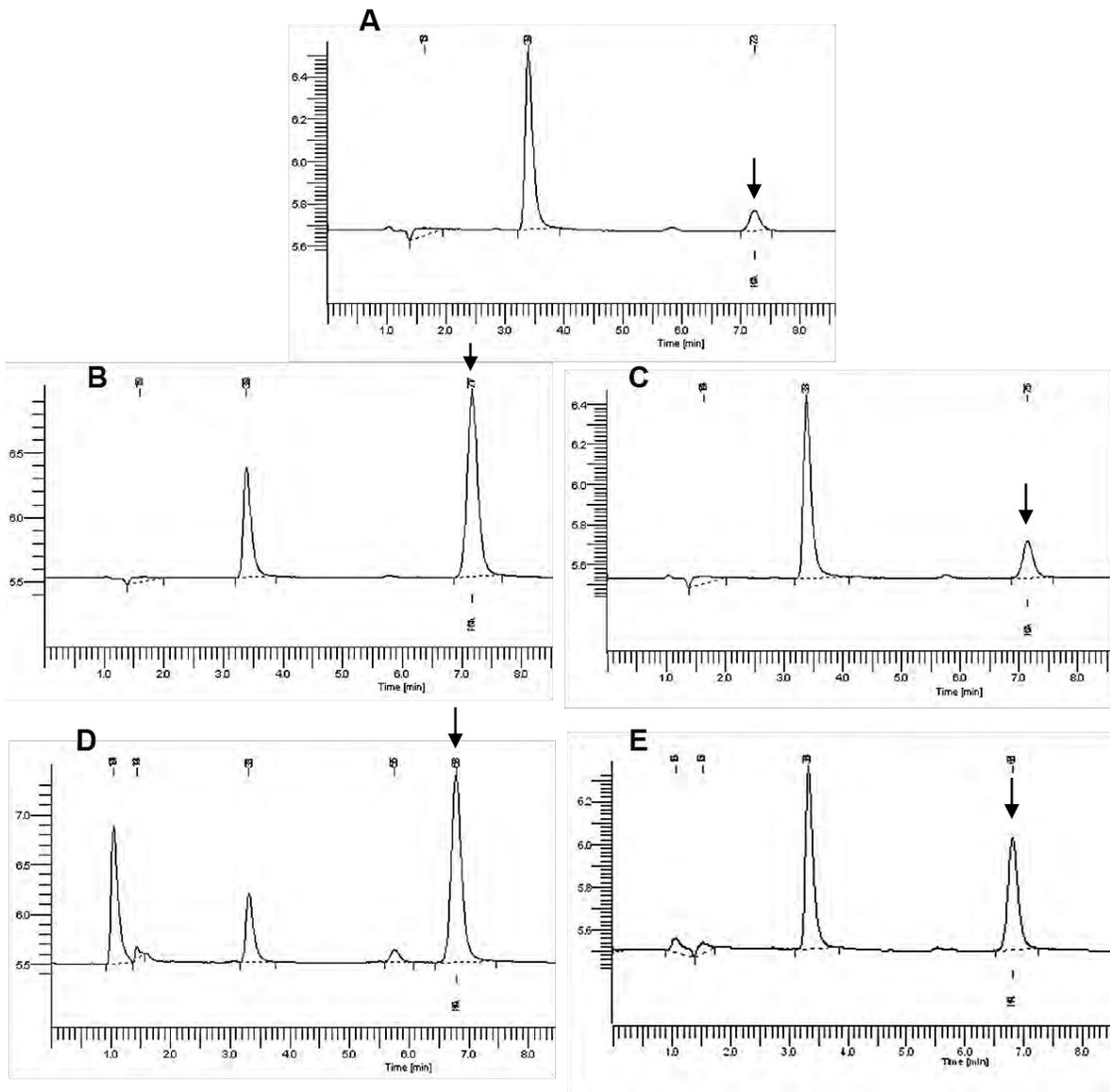


Figura 7. Cromatogramas representativos de los experimentos realizados con L-KYN y los sistemas generadores de ERO detectando KYNA (flechas negras). (A) Cromatograma control de la solución estándar de L-KYN. (B) Detección de KYNA en el minuto 7 cuando se incubó L-KYN y ONOO^- . (C) La formación de KYNA disminuye en presencia del atrapador de ONOO^- , la penicilamina. (D) Formación de KYNA a partir de L-KYN y $\bullet\text{OH}$. (E) El tamaño del pico en el tiempo de retención de KYNA disminuye cuando se agrega al ensayo el atrapador de $\bullet\text{OH}$, el DMSO.

6.2 Determinación de los factores que influyen en la formación de KYNA en sistemas libres de células

Una vez establecidas las especies reactivas que inducen la formación de KYNA al interactuar con L- o D-KYN, se establecieron las condiciones que influyen en dicha actividad. En primer lugar se probó si la concentración del sustrato (L- o D-KYN) influye en la cantidad de KYNA formado; para esto se incubaron concentraciones crecientes de ambos isómeros de KYN (1, 5, 10 y 20 μM) con $\bullet\text{OH}$ u ONOO^- y la reacción con ambas especies indujo la formación de KYNA de manera concentración-dependiente (figura 8).

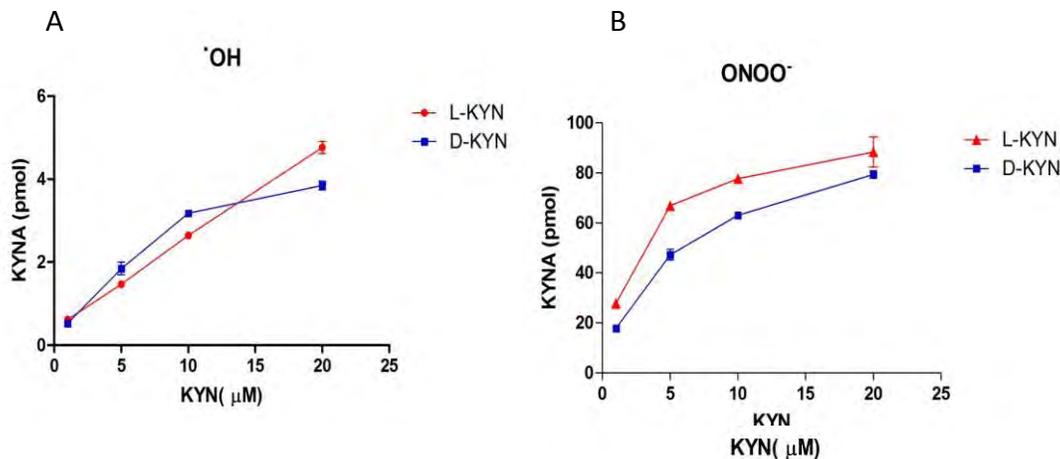


Figura 8. Concentración de KYNA formado por diferentes concentraciones de L- o D-KYN en presencia de $\bullet\text{OH}$ y ONOO^- , los ensayos se realizaron a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Los valores se expresan en promedios \pm EMS, $n = 6$.

Por otro lado se estudió si el tiempo modifica la cantidad de KYNA generado en la reacción. Al permitir reaccionar los sustratos con las ERO por 1, 15, 30 y 45 minutos no se observan diferencias en la formación de KYNA, lo cual indica que la velocidad de la reacción es muy alta, ya que desde tiempos muy cortos se detecta KYNA en la reacción y estos niveles se conservan durante mayor tiempo, sugiriendo que el tiempo no es un factor determinante en la reacción (Figura 9).

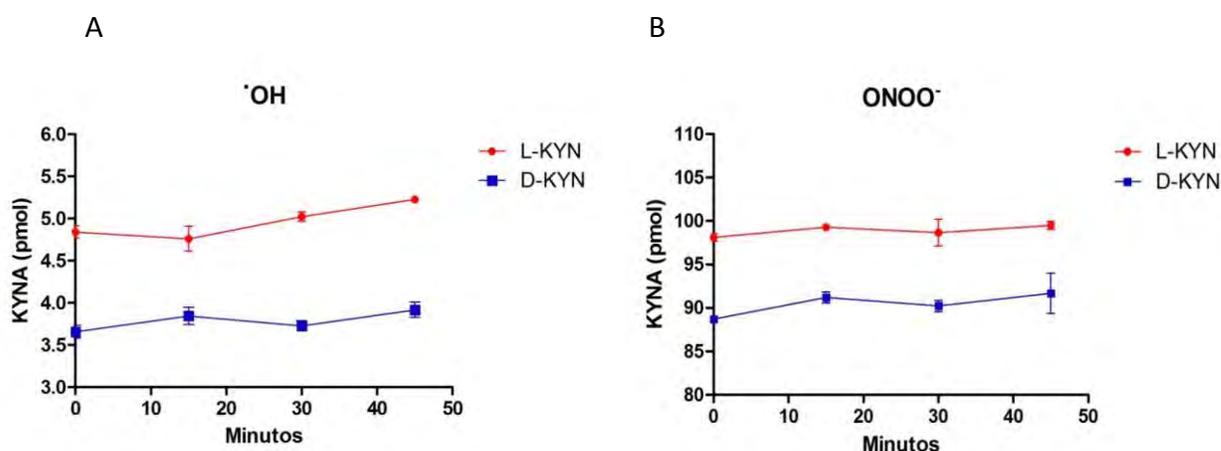


Figura 9. Formación de KYNA a través del tiempo, la detección de KYNA se realizó después de 1, 15, 30 y 45 minutos. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), la L- y D-KYN se usaron a una concentración de $20\ \mu\text{M}$. Los valores se expresan en promedios \pm ESM con $n = 6$ por ensayo.

Por otro lado, para establecer si la temperatura determinaba la formación de KYNA (Figura 10), se incubó la reacción a 4° , 21° (temperatura ambiente), 37° y 60°C , encontrando que $\bullet\text{OH}$ tiene el máximo de producción de KYNA a 37°C con ambos isómeros; lo mismo sucede cuando se realiza la reacción con ONOO^{-} , sin embargo, al compararlo a otras temperaturas,

la concentración de KYNA disminuye un 60% a 4°C, y cerca del 70% a 60°C, con ambas formas de KYN. Esto sugiere que la temperatura tiene mayor influencia en la reacción evocada por ONOO^- con los isómeros de KYN.

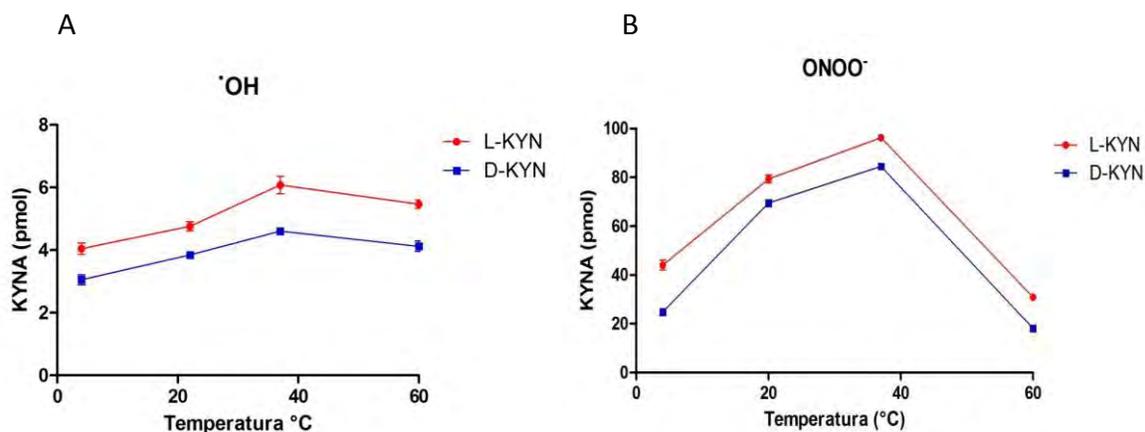


Figura 10. Formación de KYNA en presencia de $\bullet\text{OH}$ y ONOO^- al reaccionar con los isómeros de KYN (20 μM) a diferentes temperaturas (4°, 21°, 37° y 60°). Los valores se expresan en promedios \pm ESM, n = 6.

Por último, para evidenciar que la actividad de las ERO determina la formación de KYNA, se utilizaron antioxidantes específicos como dimetil sulfóxido (DMSO), que captura $\bullet\text{OH}$ y la penicilamina (PEN) que captura ONOO^- . De modo que al incubar L- o D-KYN (20 μM) con las ERO en presencia de los antioxidantes, la formación de KYNA disminuyó significativamente en todos los sistemas (Tabla 2).

Tabla 2. Diferencias en la producción de KYNA entre los isómeros de la KYN y entre ONOO⁻ y OH, así como su disminución por efecto del DMSO y la PEN.

	•OH	ONOO ⁻	•OH + DMSO	ONOO ⁻ + PEN
L-KYN (20 μM)	6.08 ± 0.27	96.3 ± 1.27	1.94 ± 0.077	21.13 ± 1
D-KYN (20 μM)	4.61 ± 0.065	84.5 ± 0.88	0.83 ± 0.053	17.26 ± 1.03

Valores expresados en promedios (pmol/mg de tejido) ± ESM n = 6.

6.3 Producción de KYNA y actividad de la KAT II en homogenados de cerebro.

Los experimentos en sistemas biológicos se llevaron a cabo, en homogenados de cerebro y cerebelo expuestos a **FeSO₄** (5 μM) en presencia de L- o D-KYN (20 μM), y la producción de KYNA se midió por HPLC. La concentración de KYNA aumenta en presencia de L- o D-KYN en los homogenados de cerebro, mostrando mayor aumento con la L-KYN, aproximadamente 70 pmol/mg de tejido, contra 20 pmol/mg de tejido, generados por la D-KYN. , Este incremento se puede atribuir a la actividad de las KAT's, estimuladas por la elevación en la concentración de los sustratos, ya que dicho incremento se abate un 50% debido a la inhibición de estas enzimas por el AOAA (1 mM).

Nuestros datos sugieren que el FeSO₄ no tiene efecto sobre los niveles de KYNA, en los homogenados de cerebro de rata, incluso con ambos isómeros; esto sugiere que la formación de •OH inducida por FeSO₄, no tiene el efecto mostrado en los sistemas sintéticos, al aumentar la formación de KYNA, sin embargo, la inhibición de las KAT's no abate por completo el aumento de KYNA en presencia de FeSO₄ (Figura 11).

Al evaluar la actividad de la KAT II se observó que ésta aumenta en presencia de L-KYN y D-KYN y disminuye con el inhibidor AOAA; el incremento evocado por el L-KYN es de aproximadamente 50 % mientras que la D-KYN la incrementa un 25%; por otro lado, la actividad enzimática tampoco se altera por acción del FeSO_4 en cerebro.

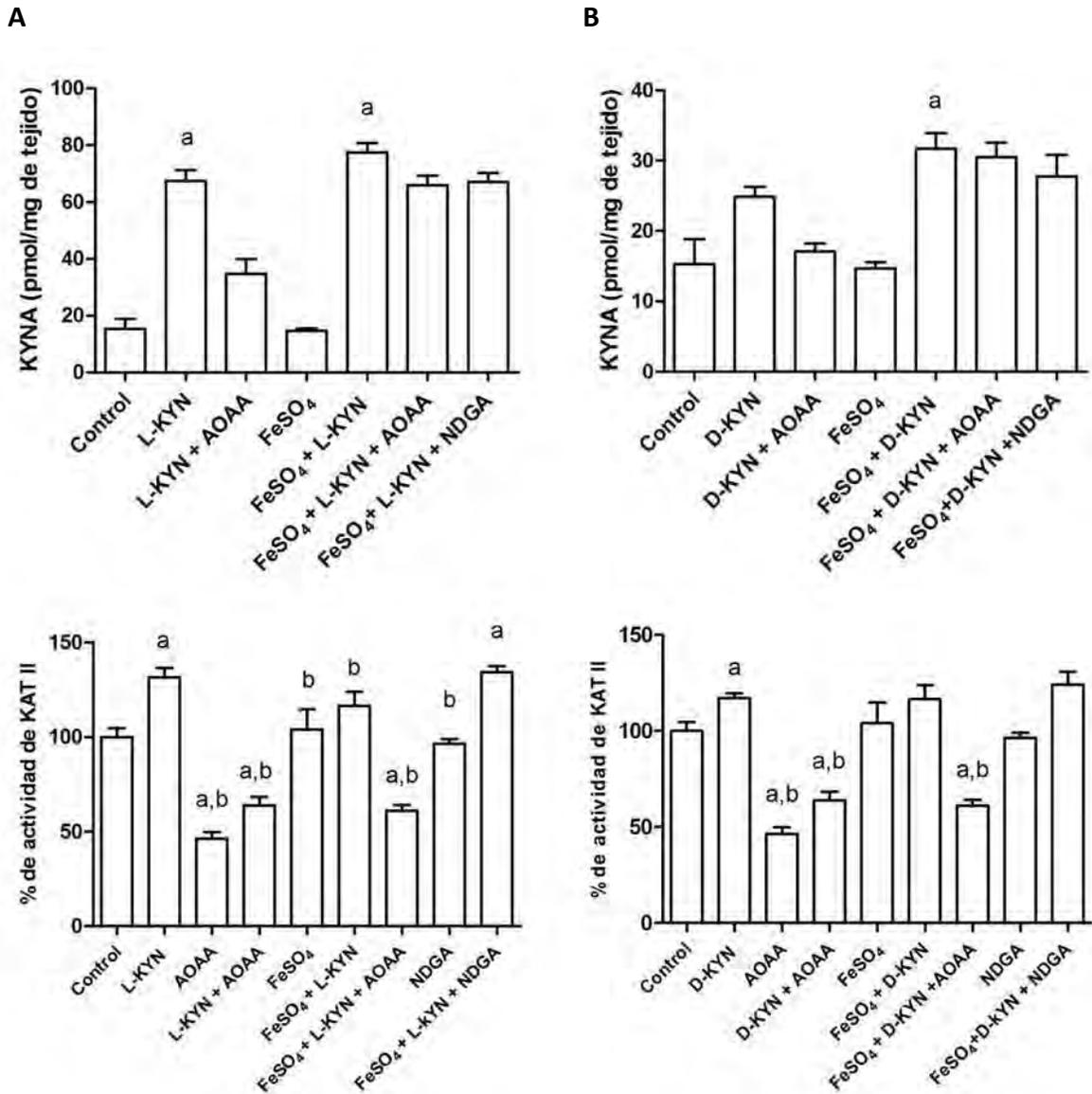


Figura 11. Efecto del FeSO_4 en la formación de KYN y actividad de la KAT II en homogenados de cerebro de rata en presencia de L-KYN (A, C) y D-KYN (B, D). Valores expresados como promedios \pm ESM ANOVA de una vía; ^a estadísticamente diferente del control y ^b estadísticamente diferente de L-KYN/D-KYN, n = 6. $P < 0.05$

Sin embargo, al realizar los mismos ensayos en los homogenados de cerebro, en presencia de los isómeros de KYN, y de **ONOO⁻** (25 μ M), esta especie reactiva sí ejerció un efecto sobre las concentraciones de KYNA en dichas muestras, a diferencia del FeSO₄ que no mostró efecto. El ONOO⁻ en conjunto con la L-KYN produjo aproximadamente 150 pmol/mg de tejido, es decir, tres veces más de lo que hace la L-KYN por sí sola; incluso, la inhibición de la KAT II, ejercida por AOAA, no disminuye la formación de KYNA (aproximadamente 130 pmol/mg de tejido), lo que indica que el excedente de KYNA formado, no corresponde totalmente a la actividad de la KAT II. Esto se evidencia con la presencia del antioxidante NDGA que abate el incremento en los niveles de KYNA, en presencia de ONOO⁻ y de L- o D-KYN. Esto sugiere que el ONOO⁻ es capturado o neutralizado por el NDGA y limita la reacción con la L- o D-KYN para formar KYNA. Lo anterior también se comprobó al evaluar la actividad de la KAT II, la cual no se vio alterada por el ONOO⁻ ni por el NDGA en los tratamientos probados, lo que indica que la producción de KYNA en presencia de ONOO⁻ es independiente de la actividad de la KAT II (Figura 12).

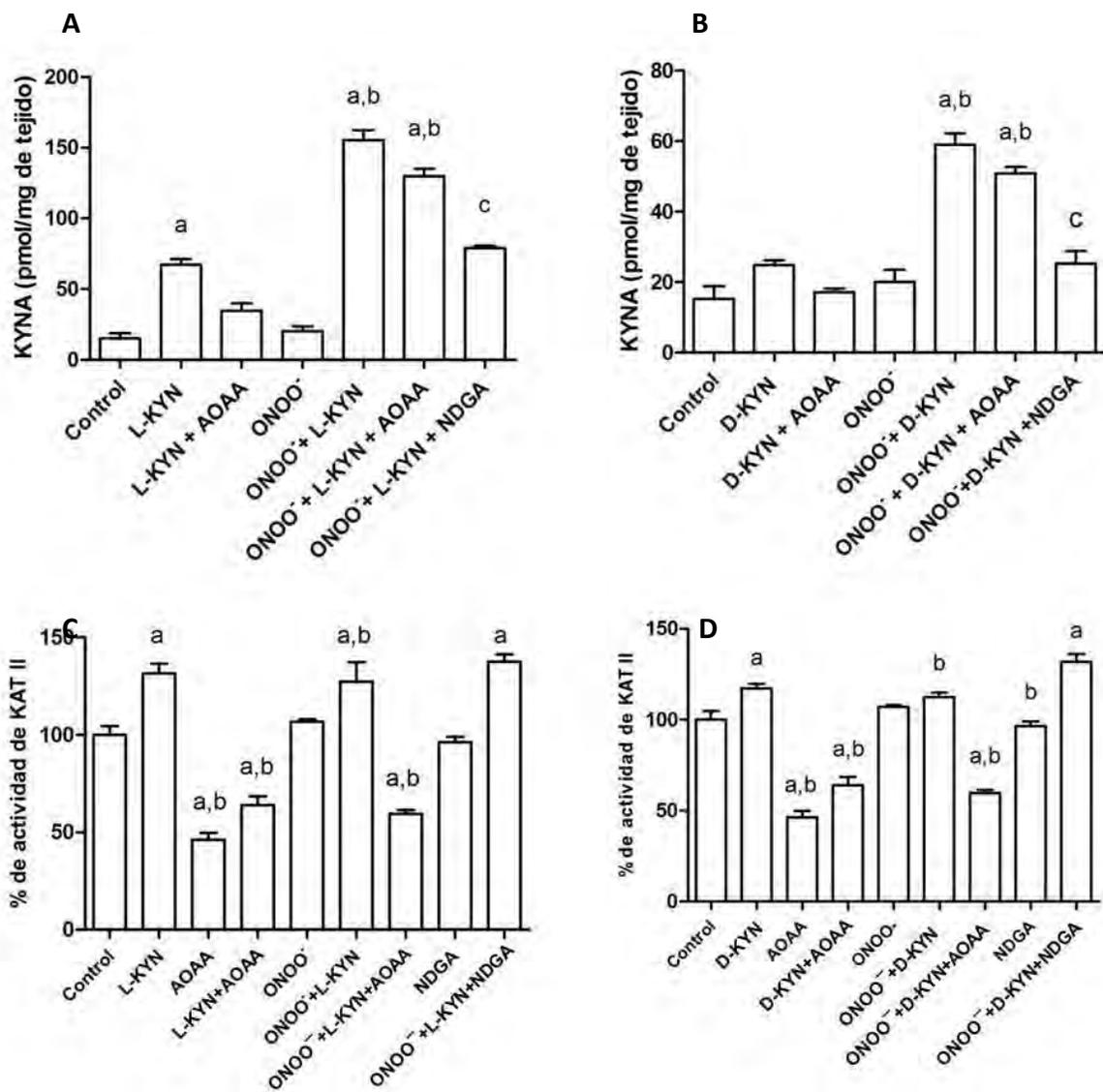


Figura 12. Efecto del **ONOO⁻** en la formación de KYNA y actividad de la KAT II en homogenados de **cerebro** de rata en presencia de L-KYN (A, C) y D-KYN (B, D). Valores expresados como promedios \pm ESM, n = 6. ANOVA de una vía; ^a estadísticamente diferente del control y ^b estadísticamente diferente de L-KYN/D-KYN, ^c estadísticamente diferente a ONOO⁻ + L-KYN/DKYN. $P < 0.05$.

6.4 Producción de KYNA y actividad de la KAT II en homogenados de cerebelo.

Los ensayos en cerebelo presentaron una tendencia similar a los realizados en cerebro, sin embargo, la cantidad de KYNA generada por L-KYN por sí solo es de aproximadamente 300 pmol/mg de tejido, es decir, casi cuatro veces más que en cerebro, mientras que el D-KYN produjo ~130 pmol/mg de tejido, cerca de 5 veces más que en cerebro. En tanto que el FeSO_4 , al igual que en cerebro, no tuvo efecto sobre la formación KYNA y no influye sobre la actividad de la KAT II (Figura 13).

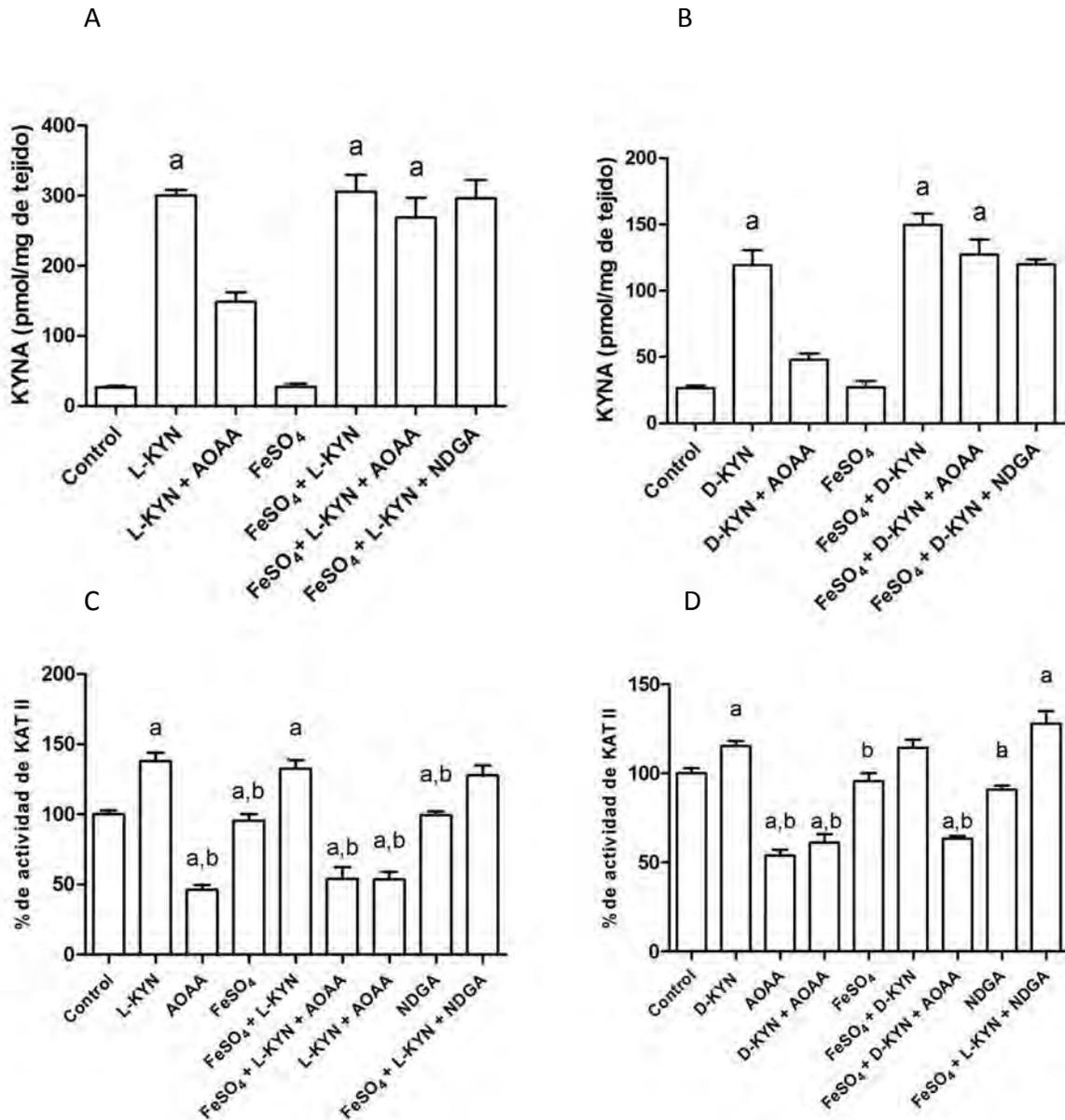


Figura 13. Efecto de FeSO₄ en la Formación de KYN y actividad de la KAT II en homogenados de **cerebelo** de rata en presencia de L-KYN (A, C) y D-KYN (B,D). Valores expresados como promedios ± ESM, n = 6. ANOVA de una vía; ^a estadísticamente diferente del control y ^b estadísticamente diferente de L-KYN/D-KYN. *P*<0.05.

En los homogenados de **cerebelo** expuestos a ONOO^- (25 μM) se observó que, en presencia de L-KYN o D-KYN, los niveles de KYNA incrementaron al doble cuando se comparan con los niveles producidos por la L- o D-KYN por sí solas. De la misma manera que ocurrió en cerebro, este incremento dado por el ONOO^- y ambos isómeros de la KYN no se abatió al inhibir la KAT II con AOAA, pero sí con la administración del antioxidante NDGA, lo que apunta a que la interacción entre ONOO^- y los isómeros de KYN aumentan la formación de KYNA en cerebelo (Figura 14). No obstante, cabe mencionar que este incremento en KYNA evocado por el ONOO^- resulta ser mayor en cerebelo que en cerebro (Tabla 3).

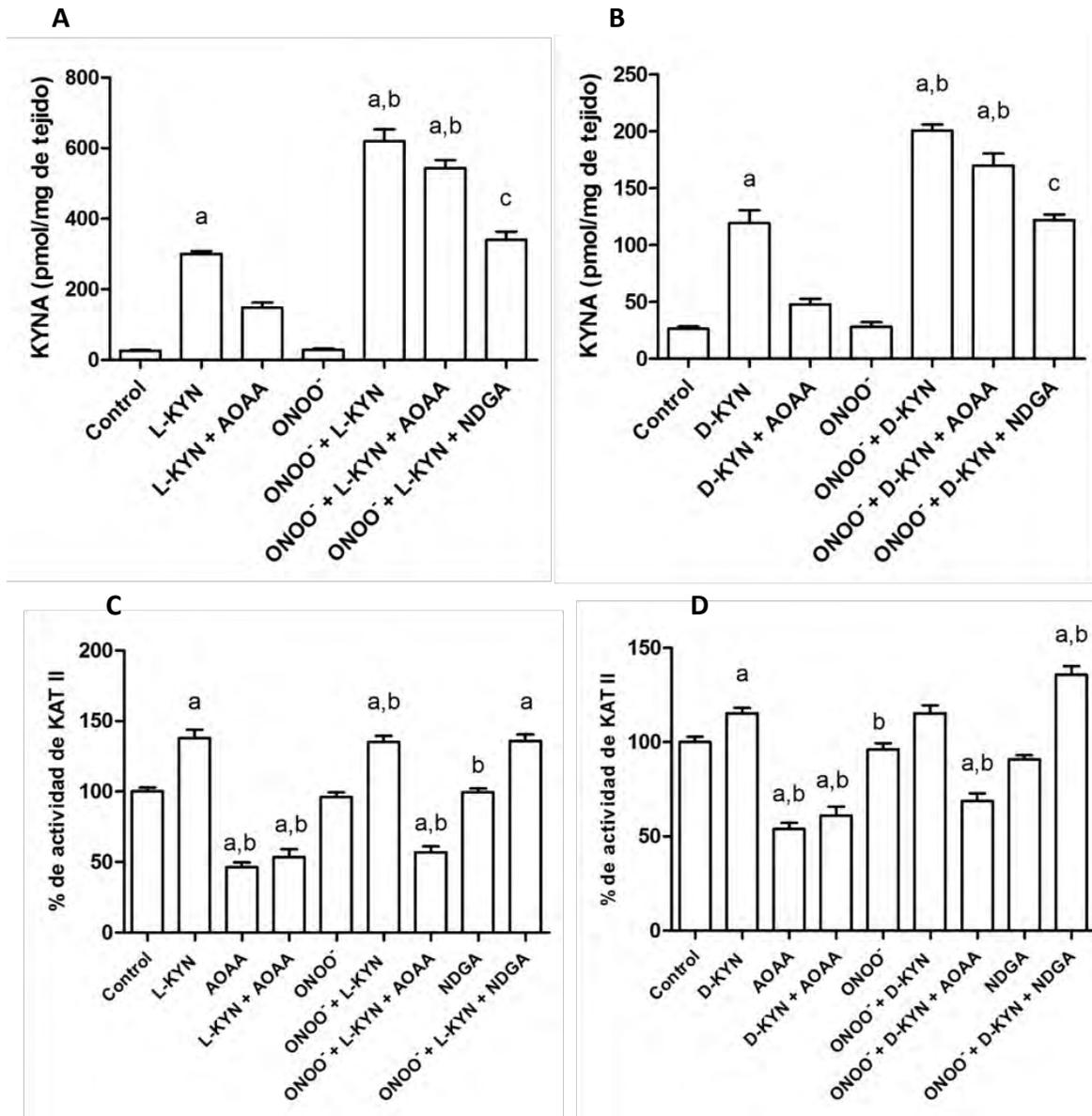


Figura 14. Formación de KYNNA y actividad de la KAT II en homogenados de **cerebelo** de rata en presencia de **ONOO⁻**, L-KYN 20 μ M (A, C) y D-KYN 20 μ M (B,D). Valores expresados como promedios \pm ESM, n = 6 . ANOVA de una vía; ^a estadísticamente diferente del control, ^b estadísticamente diferente de L-KYN/D-KYN, ^c estadísticamente diferente a ONOO⁻ + L-KYN/DKYN. $P < 0.05$.

Tabla 3. Incremento de la formación de KYNA en las diferentes condiciones estudiadas.

Tejido	Control	L-KYN	D-KYN	L-KYN + FeSO ₄	D-KYN + FeSO ₄	L-KYN + ONOO ⁻	D-KYN + ONOO ⁻
Cerebro	15.27 ± 3.5	67.4 ± 3.7	24.8 ± 1.3	77.4 ± 3.3	31.6 ± 2.2	155.4 ± 6.9	59 ± 3.1
Cerebelo	26.35 ± 2.22	300 ± 7.9	119.2 ± 11.65	305.9 ± 23.8	149.7 ± 8.3	619.9 ± 33.38	200.5 ± 5.6

Valores expresados en promedios (pmol/mg de tejido) ± ESM.

6.5 L- y D-KYN previenen la formación de ERO y peroxidación de lípidos

La formación de ERO se evaluó mediante el método de fluorescencia del diacetato de diclorofluoresceína. Utilizando homogenados se observó que tanto el FeSO₄ como el ONOO⁻ promovieron un aumento en la formación de ERO respecto al control, asimismo, este aumento en las ERO generó daño oxidante reflejado en la peroxidación de lípidos en ambos tejidos. Sin embargo, ambos isómeros, L- y D-KYN previnieron la formación de ERO y disminuyeron la peroxidación de lípidos en cerebro y cerebelo, lo cual sugiere que los isómeros de KYN están interaccionando con las ERO producidas y esto llevaría a la formación de KYNA (Figura 15).

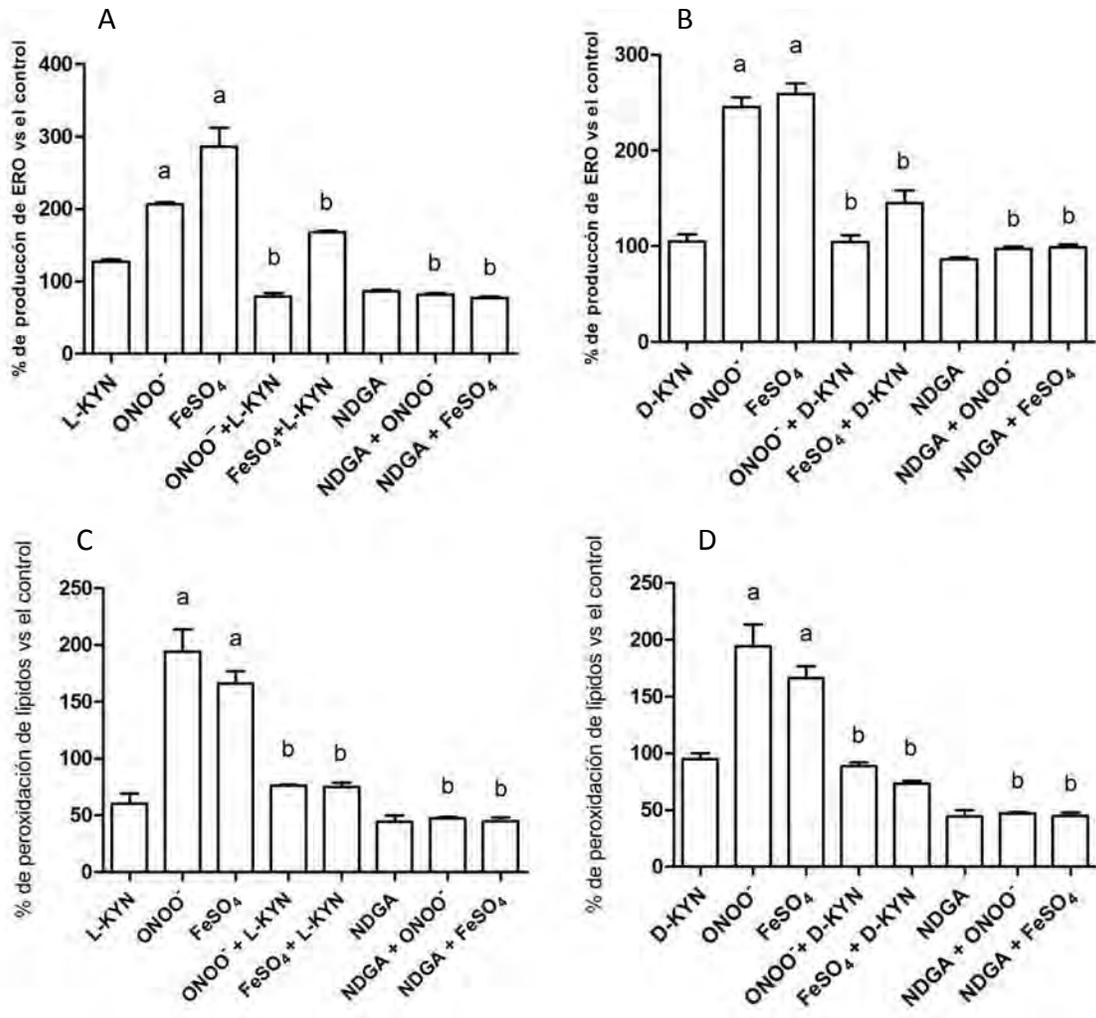


Figura 15. La formación de ERO y la peroxidación de lípidos inducida por los pro-oxidantes es atenuada por la L-KYN (20 μ M) (A, C) y D-KYN (20 μ M) (B, D) en homogenados de **cerebro**. Valores expresados en promedios \pm ESM, n = 6. ANOVA de una vía ^a estadísticamente diferente al Control, ^b diferente a ONOO⁻/FeSO₄. *P* < 0.05.

En homogenados de **cerebelo**, la L- y la D-KYN tuvieron el mismo efecto que en cerebro al prevenir la peroxidación de lípidos y el incremento en las ERO producido por el FeSO₄ y el ONOO⁻ (Figura 16).

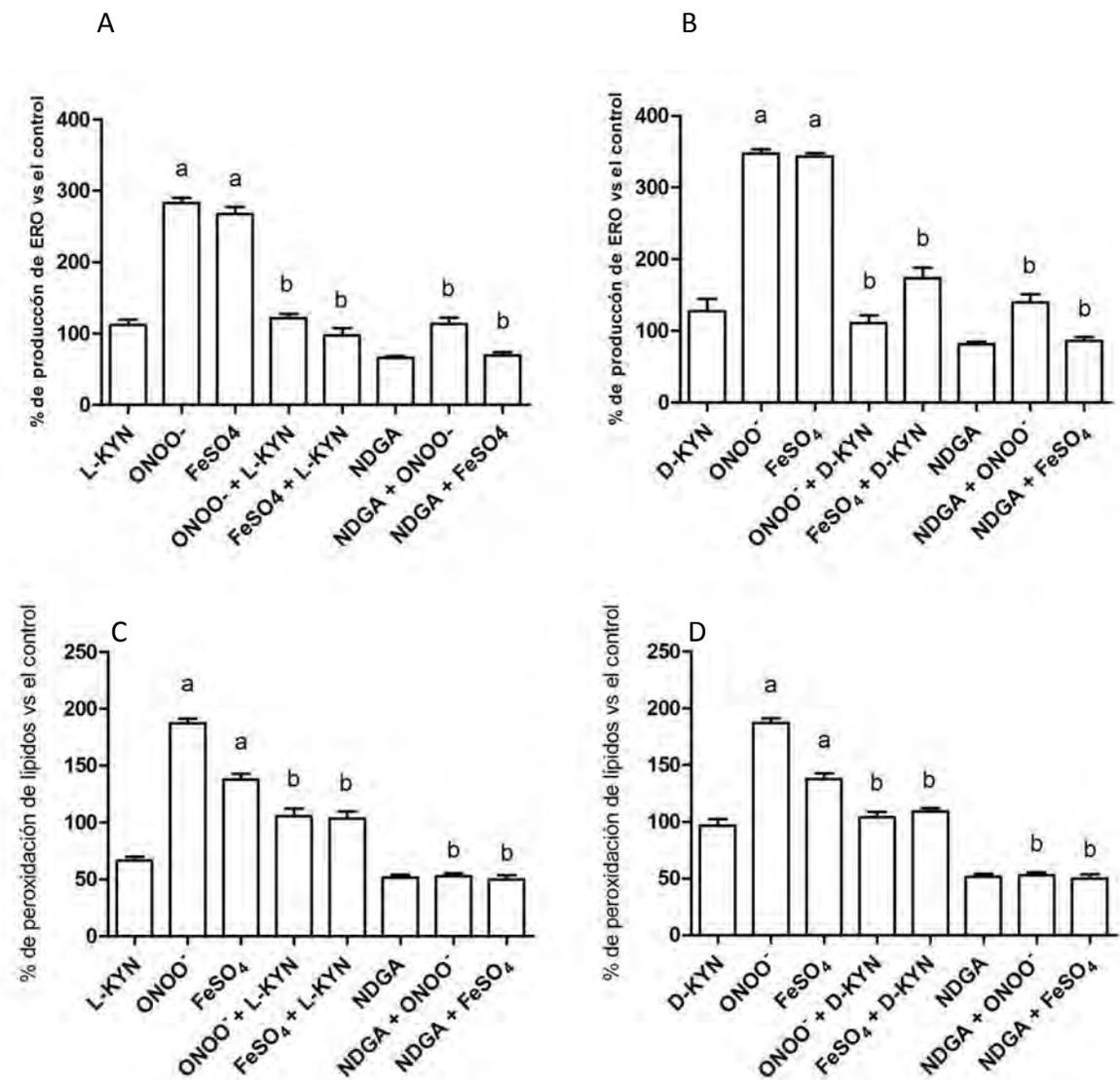


Figura 16. La formación de ERO y la peroxidación de lípidos son atenuadas por la L-KYN (20 μ M) (A, C) y D-KYN (B, D) en homogenados de **cerebelo**. Valores expresados en promedios \pm ESM, n = 6. ANOVA de una vía ^a estadísticamente diferente al Control, ^b diferente a ONOO⁻/FeSO₄. $P < 0.05$.

6.6 Incremento en las concentraciones de KYNA en cultivos primarios de astrocitos

Se analizó la producción de KYNA en cultivos primarios de astrocitos para establecer si el efecto observado en los homogenados de cerebro y cerebelo era reproducible en células viables. Los astrocitos indujeron producción muy alta de KYNA en presencia de L-KYN, cerca de 300 pmol/10,000 células, mientras que en presencia de D-KYN aumentó aproximadamente 100 pmol/10,000 células. La exposición a FeSO₄ no tuvo efectos sobre las concentraciones de KYNA, al igual que en los homogenados de tejido, mientras que el ONOO⁻ indujo un incremento significativo en la formación de KYNA, incluso al inhibir la KAT II. Por otra parte, la actividad de la KAT II no se alteró por el ONOO⁻, por lo que en los astrocitos también se puede descartar la actividad de la enzima en el aumento en KYNA (Figuras 17 y 18).

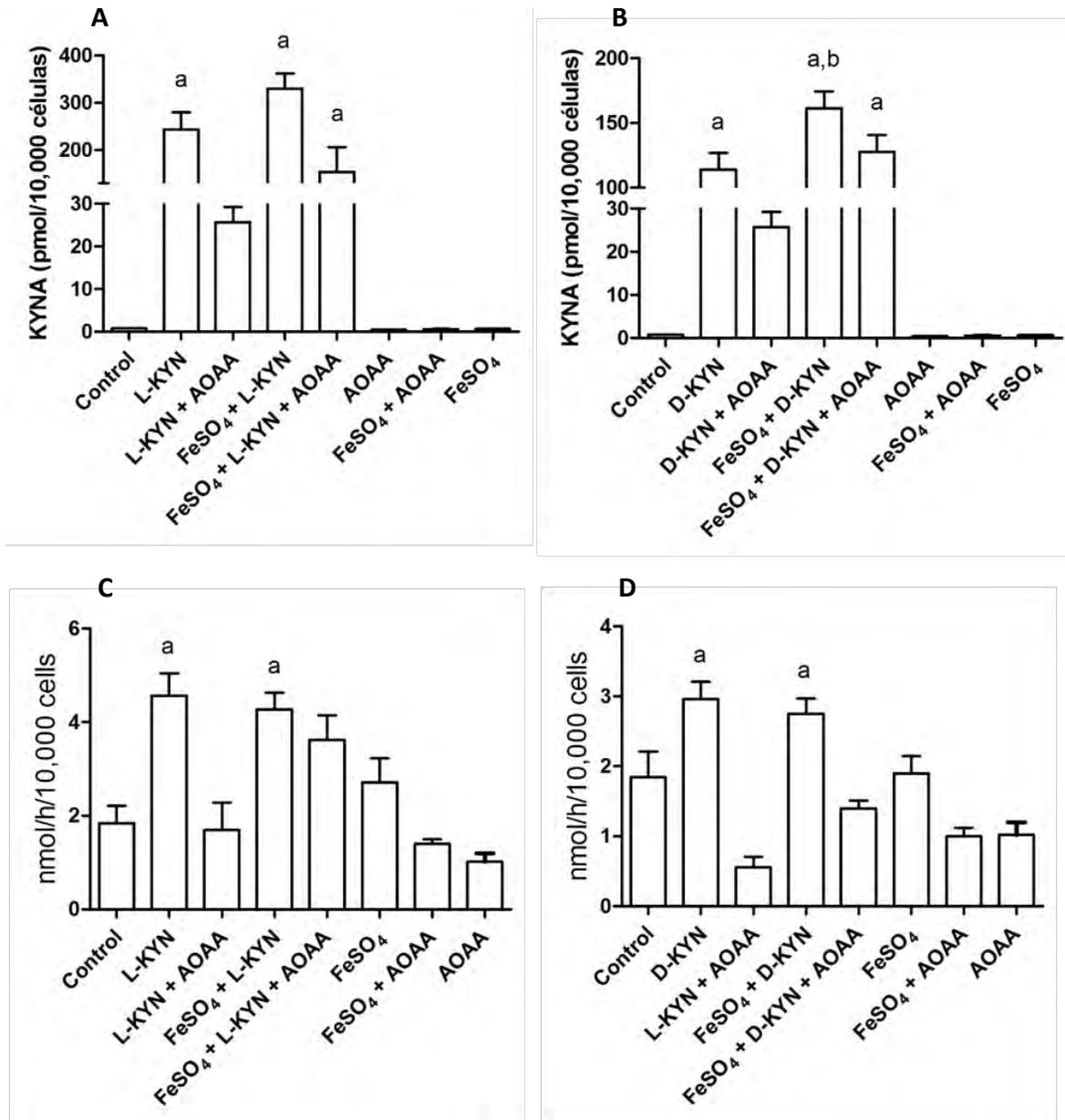


Figura 17. Producción de KYN y actividad de la KAT II en presencia de FeSO₄ en cultivos primarios de astrocitos. Valores expresados en promedios ± ESM n = 6. ANOVA de una vía, ^a estadísticamente diferente del control, ^b estadísticamente diferente de L-KYN + FeSO₄. P<0.05.

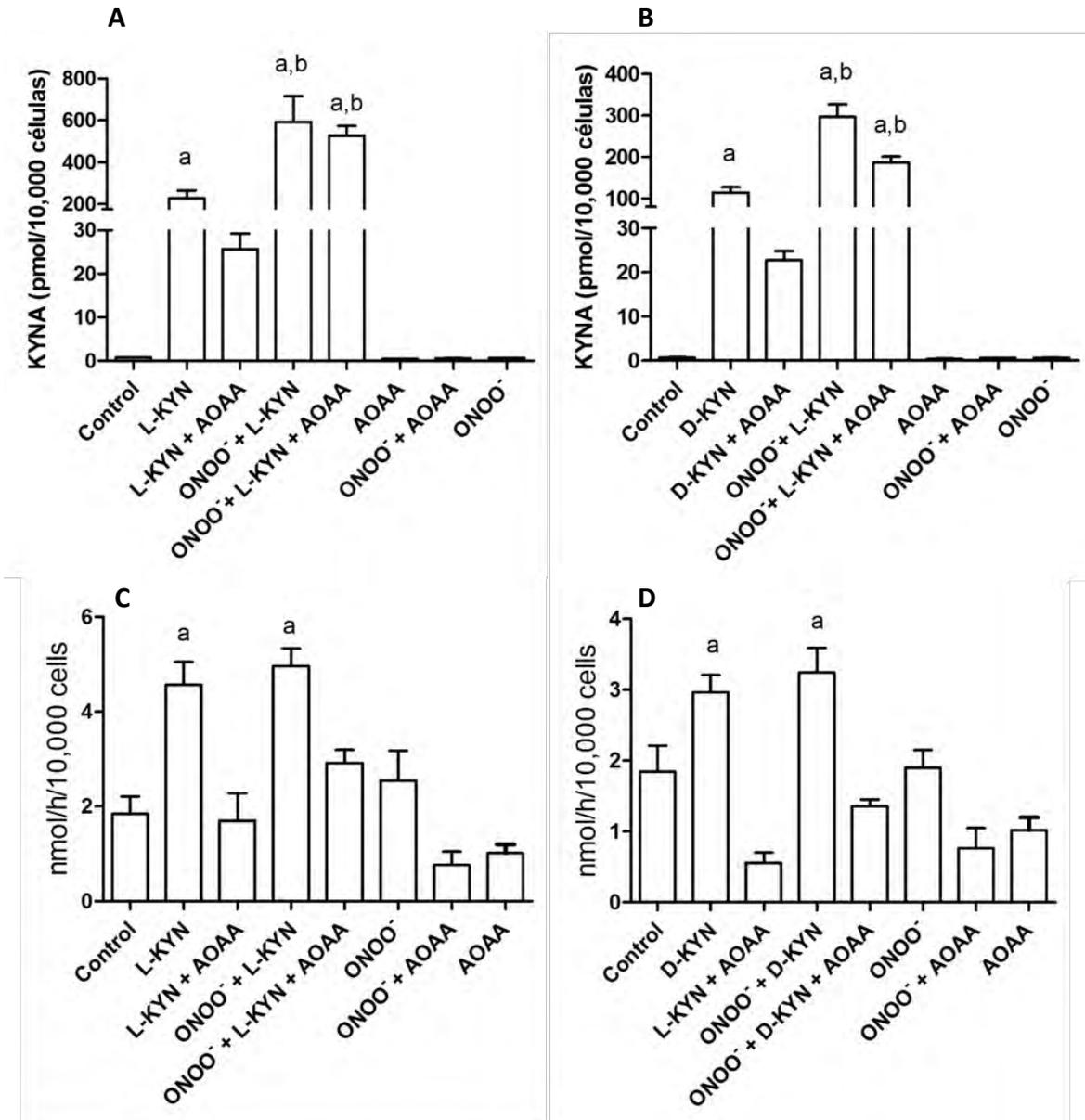


Figura 18. Producción de KYNA y actividad de la KAT II en presencia de ONOO⁻ en cultivos primarios de astrocitos. Valores expresados en promedios ± ESM n = 6. ANOVA de una vía, ^a estadísticamente diferente del control, ^b estadísticamente diferente de L-KYN + FeSO4. *P* < 0.05.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha demostrado que la interacción entre ambos isómeros de KYN y ERO llevan a la formación de KYNA, lo cual es comprobado por su identificación y cuantificación usando HPLC . En primera instancia, se probaron los sistemas sintéticos de especies reactivas ($O_2\bullet^-$, H_2O_2 , $\bullet OH$ y $ONOO^-$) y se encontró que sólo $\bullet OH$ y $ONOO^-$ fueron capaces de inducir la formación de KYNA . Anteriormente se ha observado la capacidad de L-KYN para ejercer actividad antioxidante en diversos modelos experimentales, incluyendo los sistemas sintéticos que se emplearon en el presente trabajo y en modelos biológicos (P, 2012). Los datos presentados en esta tesis concuerdan con dicho trabajo e incluso en el presente estudio, se demostró que la D-KYN podría tener el mismo efecto al capturar especies reactivas. No obstante, en otros trabajos se ha encontrado, mediante estudios electroquímicos, que la L-KYN no posee propiedades para efectuar alguna actividad redox en la célula, en comparación con otros metabolitos de la vía que sí poseen un potencial redox (Giles, Collins, Stone, & Jacob, 2003), sin embargo, queda clara la gran capacidad que tiene la L-KYN de interactuar con las ERO dadas las evidencias antes citadas. Con los resultados presentados no sólo establecimos que la interacción de L-KYN con especies reactivas tiene efecto sobre los niveles de KYNA, sino que también el isómero D- induce este efecto, además de que lo puede hacer a través de otros mecanismos previamente descritos (Fukushima et al., 2009; Perez-de la Cruz et al., 2012).

Los resultados aquí presentados hacen evidente que no todas las especies reactivas probadas interactúan con la KYN para formar KYNA; incluso, en los sistemas biológicos

donde sólo tuvo efecto el ONOO^- sin embargo no se puede descartar del todo la actividad del $\bullet\text{OH}$ dados los resultados que arrojó en los sistemas sintéticos donde este radical sí fue capaz de inducir la formación de KYNA. Es posible que al probar otros modelos de inducción de este radical se obtengan distintos efectos. Asimismo, se sabe que varias de las especies reactivas conocidas dan lugar a la formación de otras especies diferentes derivando una serie de reacciones en cadena, lo cual implica que probablemente estén participando varias especies en paralelo, potenciando el efecto al reaccionar con L-KYN. Un ejemplo de esto es el que se ha descrito donde la hidrólisis de ONOO^- puede generar $\bullet\text{OH}$ (Beckman, Beckman, Chen, Marshall, & Freeman, 1990; Kaur, Whiteman, & Halliwell, 1997) y quizá ambos pueden interactuar con la L-KYN y generar un efecto sinérgico en la producción de KYNA.

Por otra parte, al evaluar las condiciones que influyeron en la reacción se encontró que la formación de KYNA es dependiente de la concentración de la L- y la D-KYN, y que el ONOO^- genera mayor cantidad de KYNA que $\bullet\text{OH}$ y a su vez la L-KYN tiene mayor efecto que la D-KYN, por lo que la combinación con ONOO^- es la más eficiente en la formación de KYNA. Cuando se evaluó si el tiempo era determinante en la reacción, se observó que este no afecta el curso de la acción de las ERO sobre la L- y la D-KYN; tal parece que la reacción es instantánea y el producto final no cambia, manteniéndose constantes las concentraciones de KYNA formado en el sistema a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Esto también indica que posiblemente los productos que se forman en la reacción son estables, es decir, que quizá no se formen nuevas especies reactivas o subproductos muy reactivos que interfieran en la formación de KYNA, al menos en los tiempos evaluados en este trabajo.

En los sistemas de química combinatoria se determinó si variar la temperatura a la que se efectúa la reacción, tiene consecuencias sobre el producto y los resultados obtenidos muestran que a baja temperatura (4° C) la cantidad de KYNA es menor en comparación a la formada a temperatura ambiente (~25° C) y a 37° C, siendo ésta última a la cual se forma la mayor cantidad de KYNA, lo que sugeriría que a la temperatura interna fisiológica se favorecería la formación de KYNA en presencia de ERO y KYN. No obstante, se observó que a 60°C las concentraciones de KYNA disminuyen en los sistemas sintéticos, probablemente por la rápida degradación de los reactivos. Finalmente, en los experimentos en los sistemas sintéticos se pudo evidenciar el papel determinante que jugaron las ERO en la formación de KYNA ya que al agregar DMSO o PEN, que capturan con eficiencia $\bullet\text{OH}$ y ONOO^- , respectivamente (Floriano-Sanchez et al., 2006), disminuye la cantidad de estas especies disponible para reaccionar con la L- y la D-KYN y atenuando así la producción de KYNA.

Los resultados obtenidos en homogenados de cerebro y cerebelo hicieron evidente que sólo el ONOO^- indujo un aumento significativo en las concentraciones de KYNA, en comparación al $\bullet\text{OH}$, que no presentó tal efecto; similar a lo obtenido en los sistemas sintéticos donde la producción de KYNA evocada por el ONOO^- fue mayor que la que indujo el $\bullet\text{OH}$ y de nuevo, este efecto del ONOO^- se atenuó por la presencia de un antioxidante como el NDGA;. Aunado a esto, se tiene que la actividad de la KAT II no se alteró por la presencia de ONOO^- , lo que indica que este anión no incrementa la actividad de la enzima y su efecto se debe a otra interacción que, a la luz de los resultados, incluye la reacción con la L- y D-KYN. No obstante, el método para medir actividad enzimática empleado en este trabajo, es específico para medir a la KAT II y se debe tener en cuenta que existen más isoformas de la

KAT, de las cuales no podemos descartar del todo su actividad en los experimentos, ya que también emplean a la L-KYN como sustrato. Sin embargo, fisiológicamente, se sabe que la KAT II es a la que se le confiere la mayor producción de KYNA en la célula (Guidetti et al., 1997; Han et al., 2009) por lo que al inhibirla vía el AOAA, se atenúa la mayor proporción del aporte de KYNA lo que permite observar el efecto de las especies reactivas. Otro dato interesante es la diferencia observada entre los homogenados de cerebro y los de cerebelo, incluso incubando las muestras sólo con los precursores (Tabla 3); el cerebelo indujo un incremento de casi 5 veces mayor que en los homogenados de cerebro. Esto representa un nuevo paradigma sobre los procesos de formación de KYNA, ya que como describió Turski y cols.(Turski et al., 1988), el cerebelo es la región en la que se detectó la menor cantidad de KYNA respecto a otras áreas. Suponiendo que bajo algún estímulo, como un insulto oxidante en el caso del presente trabajo, se genere una gran cantidad de KYNA, en este sentido sería de gran importancia estudiar los procesos que pudieran estar involucrados en esta gran diferencia en la formación de KYNA entre cerebro y cerebelo y plantear preguntas como: 1) ¿cuáles son las propiedades que le confieren al cerebelo aumentar los niveles de KYNA que difieren de los presentes en el resto del cerebro?, 2) ¿se observarán diferencias entre otras regiones del cerebro como el cuerpo estriado, hipocampo, corteza, etc? y 3) ¿el KYNA producido a partir de la interacción entre las ERO y la L-y D-KYN tendrá algún efecto biológico protector o afectará a los diversos sistemas en los que se ha descrito puede ejercer su acción? Estas preguntas se podrán responder continuando con el estudio sobre esta nueva ruta de formación de KYNA y probar si este efecto se observa en diferentes modelos de estrés oxidante.

Por último, uno de los objetivos de este trabajo fue ofrecer una propuesta sobre los pasos involucrados en la reacción entre la KYN y las ERO y con base a los resultados obtenidos se contempla la reacción dada entre el ONOO^- y la KYN en un medio acuoso (Figura 19). La reacción inicia cuando el ONOO^- oxida al grupo amino en la posición 2 del anillo aromático de la L-KYN, generando un amino radical ($\bullet\text{NH}$) que ataca al carboxilo unido al carbono alfa oxidándolo y generando un carboxilo radical. En el paso 2 de la reacción se da el cierre del anillo para formar la quinolina, que se caracteriza por presentar dos anillos aromáticos y un amino en la posición 1. A continuación la molécula sufre la desaminación del carbono alfa resultando en la liberación de amoníaco (NH_3) y un hidrógeno. En el cuarto paso, el doble enlace de la cetona en posición 4 sufre una ruptura del doble enlace derivando en la formación de un hidroxilo en la misma posición. En el quinto paso se libera el electrón del carboxilo radical en la posición 2 dada por oxígeno. Por último se libera un hidrógeno que al reaccionar con un hidroxilo del medio formaría agua.

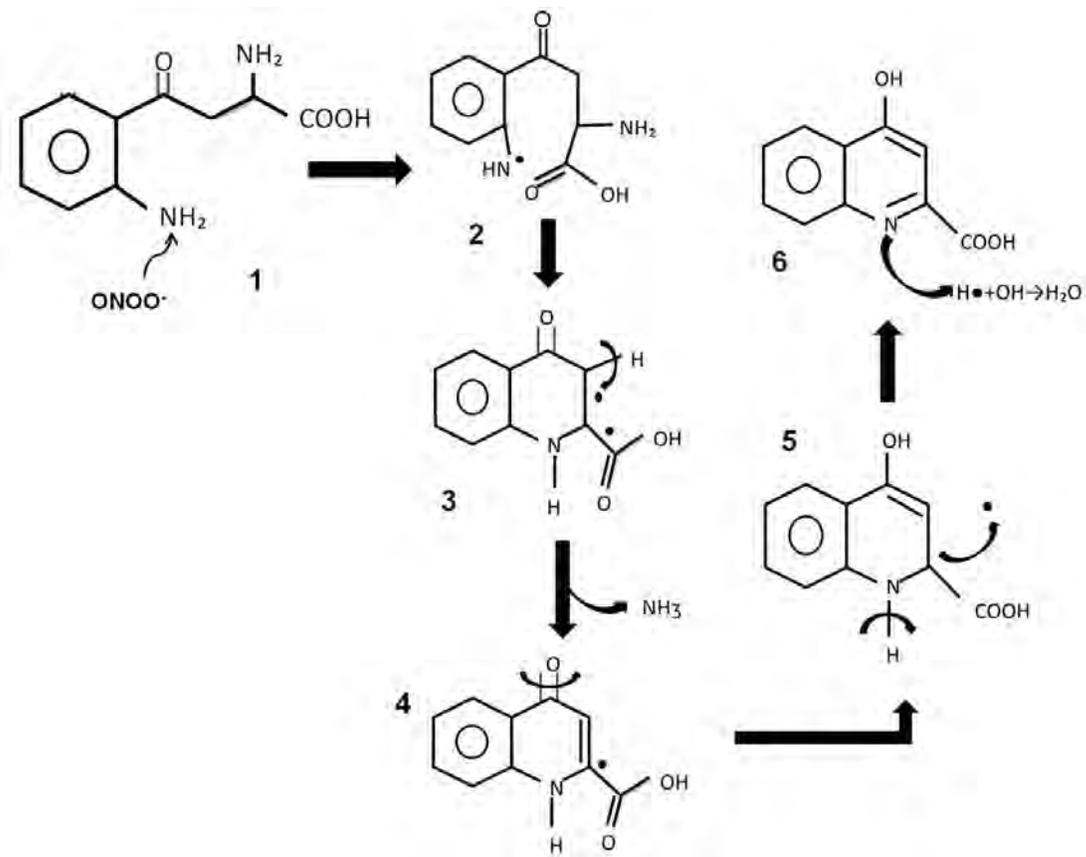


Figura 19. Formación de KYNA a partir de la reacción entre L-KYN y ONOO. Establecida por el Dr. Miguel Ángel García Sánchez, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (2013).

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se planteó determinar la formación de KYNA en diversos modelos de formación de ERO tanto sintéticos de química combinatoria, como biológicos como homogenados de cerebro, cerebelo y cultivos primarios de astrocitos. En primer lugar se demostró que L-KYN tiene la capacidad de reaccionar con diferentes ERO, como se había reportado con anterioridad (P, 2012). Este aminoácido tiene la capacidad de reaccionar con radicales libres, sin embargo, fue posible determinar que posterior a esta acción se produce la formación de KYNA, (cuyos niveles se midieron por HPLC) y esto sucede independientemente de la actividad enzimática de la KAT II. No obstante, es deseable y como parte de la culminación de este proyecto, evidenciar la presencia de KYNA en estos modelos a través de otras metodologías de detección y cuantificación de compuestos como la espectrometría de masas o incluso la resonancia magnética nuclear, que en conjunto nos brindarán mayor información para comprobar la formación de KYNA. Por último, éste trabajo se une a la gama de estudios que se han realizado recientemente sobre las diversas vías que pueden estar involucradas en la producción de KYNA, que ofrecen posibles explicaciones sobre las observaciones en diversas enfermedades o modelos, donde las concentraciones de éste metabolito sufren un incremento que no puede ser totalmente explicado por la actividad de las KAT's. Así, también sería de gran relevancia investigar el efecto que produce este incremento de KYNA, dado por las ERO sobre sistemas biológicos y en diferentes modelos experimentales y complementar la información que ha surgido

recientemente, sobre los posibles efectos deletéreos que podría ejercer el KYNA dada su actividad antagónica sobre receptores NMDA y $\alpha 7$ -nicotínicos.

9. REFERENCIAS

- Aikens, J., & Dix, T. A. (1991). Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, *266*(23), 15091-15098.
- Albanese, A. A., Frankston, J. E., & Irby, V. (1945). The utilization of d-amino acids by man. *J Biol Chem*, *160*, 441-447.
- Albuquerque, E. X., & Schwarcz, R. (2013). Kynurenic acid as an antagonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges. *Biochem Pharmacol*, *85*(8), 1027-1032. doi: 10.1016/j.bcp.2012.12.014
- Banerjee, J., Alkondon, M., & Albuquerque, E. X. (2012). Kynurenic acid inhibits glutamatergic transmission to CA1 pyramidal neurons via alpha7 nAChR-dependent and -independent mechanisms. *Biochem Pharmacol*, *84*(8), 1078-1087. doi: 10.1016/j.bcp.2012.07.030
- Baran, H. J., K. Deecke, L. . (1999). Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, *106*, 165-161-181.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(4), 1620-1624.
- Beggiato, S., Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tanganelli, S., Fuxe, K., Schwarcz, R., & Ferraro, L. (2013). Kynurenic acid, by targeting alpha7 nicotinic acetylcholine receptors, modulates extracellular GABA levels in the rat striatum in vivo. *Eur J Neurosci*, *37*(9), 1470-1477. doi: 10.1111/ejn.12160
- Beggiato, S., Tanganelli, S., Fuxe, K., Antonelli, T., Schwarcz, R., & Ferraro, L. (2014). Endogenous kynurenic acid regulates extracellular GABA levels in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, *82C*, 11-18. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.02.019
- Cárdenas-Rodríguez N, P.-C. J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, *14*, 164-173.
- Carpeneo, R., Pittaluga, A., Cozzi, A., Attucci, S., Galli, A., Raiteri, M., & Moroni, F. (2001). Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci*, *13*(11), 2141-2147.
- Carrillo-Mora, P., Mendez-Cuesta, L. A., Perez-De La Cruz, V., Fortoul-van Der Goes, T. I., & Santamaria, A. (2010). Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. *Behav Brain Res*, *210*(2), 240-250. doi: 10.1016/j.bbr.2010.02.041
- Choe, M., Jackson, C., & Yu, B. P. (1995). Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med*, *18*(6), 977-984.
- Ellinger, A. (1904). Die entstehung der Kynurenäure. *Z Physiol Chem*, *43*, 325-337.
- Floriano-Sanchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O. N., Rocha, D., Sanchez-Gonzalez, D. J., Cardenas-Rodriguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res*, *40*(5), 523-533. doi: 10.1080/10715760500419365
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., & Smith, Q. R. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem*, *56*(6), 2007-2017.

- Fukushima, T., Sone, Y., Mitsuhashi, S., Tomiya, M., & Toyo'oka, T. (2009). Alteration of kynurenic acid concentration in rat plasma following optically pure kynurenine administration: a comparative study between enantiomers. *Chirality*, *21*(4), 468-472. doi: 10.1002/chir.20620
- Gal, E. M., & Sherman, A. D. (1978). Synthesis and metabolism of L-kynurenine in rat brain. *J Neurochem*, *30*(3), 607-613.
- Giles, G. I., Collins, C. A., Stone, T. W., & Jacob, C. (2003). Electrochemical and in vitro evaluation of the redox-properties of kynurenine species. *Biochem Biophys Res Commun*, *300*(3), 719-724.
- Goda, K., Kishimoto, R., Shimizu, S., Hamane, Y., & Ueda, M. (1996). Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active Oxygens during cell death in the brain. *Adv Exp Med Biol*, *398*, 247-254.
- Gramsbergen, J. B., Hodgkins, P. S., Rassoulpour, A., Turski, W. A., Guidetti, P., & Schwarcz, R. (1997). Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. *J Neurochem*, *69*(1), 290-298.
- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*, *11*(7), 526-534.
- Guidetti, P., Luthi-Carter, R. E., Augood, S. J., & Schwarcz, R. (2004). Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, *17*(3), 455-461. doi: 10.1016/j.nbd.2004.07.006
- Guidetti, P., Okuno, E., & Schwarcz, R. (1997). Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res*, *50*(3), 457-465.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*, *15*(4), 129-135.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, *1*(8391), 1396-1397.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Aruoma, O. I. (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.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (4th ed.). Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Han, Q., Robinson, H., Cai, T., Tagle, D. A., & Li, J. (2009). Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III. *Mol Cell Biol*, *29*(3), 784-793. doi: 10.1128/MCB.01272-08
- Hardeland, R. Z., BK. . (1997). Kynurenic acid as a free radical scavenger: Measurements of educt and product fluorescence and of light emission from an excited intermediate state. In R. Hardeland (Ed.), *Biological Rhythms and Antioxidative Protection* (pp. 153-160): Cuvillier, Göttingen.
- Harris, C. M., & Massey, V. (1997). The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem*, *272*(13), 8370-8379.
- Heyes, M. P., Jordan, E. K., Lee, K., Saito, K., Frank, J. A., Snoy, P. J., . . . Gravel, M. (1992). Relationship of neurologic status in macaques infected with the simian immunodeficiency virus to cerebrospinal fluid quinolinic acid and kynurenic acid. *Brain Res*, *570*(1-2), 237-250.
- Hilmas, C., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci*, *21*(19), 7463-7473.

- Hirata, F., & Hayaishi, O. (1971). Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem*, 246(24), 7825-7826.
- Joseph, M. H. (1978a). Brain tryptophan metabolism on the 5-hydroxytryptamine and kynurenine pathways in a strain of rats with a deficiency in platelet 5-HT. *Br J Pharmacol*, 63(3), 529-533.
- Joseph, M. H. (1978b). Determination of kynurenine by a simple gas-liquid chromatographic method applicable to urine, plasma, brain and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr*, 146(1), 33-41.
- Joseph, M. H., Baker, H. F., & Lawson, A. M. (1978). Positive identification of kynurenine in rat and human brain [proceedings]. *Biochem Soc Trans*, 6(1), 123-126.
- Kaur, H., Whiteman, M., & Halliwell, B. (1997). Peroxynitrite-dependent aromatic hydroxylation and nitration of salicylate and phenylalanine. Is hydroxyl radical involved? *Free Radic Res*, 26(1), 71-82.
- Kehrer, J. P. (2000). Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology*, 62(4), 235-236. doi: 10.1002/1096-9926(200010)62:4<235::AID-TERA11>3.0.CO;2-3
- Khoronenkova, S. V., & Tishkov, V. I. (2008). D-amino acid oxidase: physiological role and applications. *Biochemistry (Mosc)*, 73(13), 1511-1518.
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., . . . Walborg, E. F., Jr. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 1, 289-295.
- Knyihar-Csillik, E., Csillik, B., Pakaski, M., Krisztin-Peva, B., Dobo, E., Okuno, E., & Vecsei, L. (2004). Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment. *Neuroscience*, 126(4), 899-914. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.04.043
- Liebig, J. (1853). Über kynurensäure. Justus Liebig's. *Ann Chem*, 86, 125-126.
- Lindahl, T., & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897-1905.
- Luchowski, P., Luchowska, E., Turski, W. A., & Urbanska, E. M. (2002). 1-Methyl-4-phenylpyridinium and 3-nitropropionic acid diminish cortical synthesis of kynurenic acid via interference with kynurenine aminotransferases in rats. *Neurosci Lett*, 330(1), 49-52.
- Lugo-Huitron, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muniz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverri, J., Silva-Adaya, D., . . . La Cruz, V. P. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol*, 33(5), 538-547. doi: 10.1016/j.ntt.2011.07.002
- M, Z., & Y, S. (1996). Papel Fisiológico de los radicales libres. *Boletín de Educación Bioquímica*, 15, 152 - 161.
- Mason, M., & Berg, C. P. (1952). The metabolism of d- and l-tryptophan and d- and l-kynurenine by liver and kidney preparations. *J Biol Chem*, 195(2), 515-524.
- May, J. M., Cobb, C. E., Mendiratta, S., Hill, K. E., & Burk, R. F. (1998). Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, 273(36), 23039-23045.
- Mehler, A. H., & Knox, W. E. (1950). The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. II. The enzymatic hydrolysis of formylkynurenine. *J Biol Chem*, 187(1), 431-438.
- 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., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., & Carla, V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *J Neurochem*, 51(1), 177-180.
- Nishikimi, M., Appaji, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*, 46(2), 849-854.

- Ogawa, T., Matson, W. R., Beal, M. F., Myers, R. H., Bird, E. D., Milbury, P., & Saso, S. (1992). Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology*, *42*(9), 1702-1706.
- Okuno, A., Fukuwatari, T., & Shibata, K. (2011). High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum. *J Neurochem*, *118*(5), 796-805. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07369.x
- Okuno, E., Kohler, C., & Schwarcz, R. (1987). Rat 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase: purification from the liver and immunocytochemical localization in the brain. *J Neurochem*, *49*(3), 771-780.
- P, U.-M. (2012). *L-KYN como atrapador de especies reactivas y antioxidante en diferentes modelos pro-oxidantes*. (Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México, D.F.
- Parsons, C. G., Danysz, W., Quack, G., Hartmann, S., Lorenz, B., Wollenburg, C., . . . Headley, P. M. (1997). Novel systemically active antagonists of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor: electrophysiological, biochemical and behavioral characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, *283*(3), 1264-1275.
- Perez-de la Cruz, V., Amori, L., Sathyasaikumar, K. V., Wang, X. D., Notarangelo, F. M., Wu, H. Q., & Schwarcz, R. (2012). Enzymatic transamination of D-kynurenine generates kynurenic acid in rat and human brain. *J Neurochem*, *120*(6), 1026-1035. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07653.x
- Ponti, V., Dianzani, M. U., Cheeseman, K., & Slater, T. F. (1978). Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem Biol Interact*, *23*(3), 281-291.
- Powers, S. K., & Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, *58*(4), 1025-1033.
- Prescott, C., Weeks, A. M., Staley, K. J., & Partin, K. M. (2006). Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neurosci Lett*, *402*(1-2), 108-112. doi: 10.1016/j.neulet.2006.03.051
- Reiter, R. J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, *12*(2), 151-180.
- Rice-Evans, C., & Burdon, R. (1993). Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res*, *32*(1), 71-110.
- Rozsa, E., Robotka, H., Vecsei, L., & Toldi, J. (2008). The Janus-face kynurenic acid. *J Neural Transm*, *115*(8), 1087-1091. doi: 10.1007/s00702-008-0052-5
- Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A., & Lowry, C. A. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med*, *8*(20), 1-27. doi: 10.1017/S1462399406000068
- Santamaria, A., Rios, C., Solis-Hernandez, F., Ordaz-Moreno, J., Gonzalez-Reynoso, L., Altagracia, M., & Kravzov, J. (1996). Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*, *35*(1), 23-28.
- Schwarcz, R., Du, F., Schmidt, W., Turski, W. A., Gramsbergen, J. B., Okuno, E., & Roberts, R. C. (1992). Kynurenic acid: a potential pathogen in brain disorders. *Ann N Y Acad Sci*, *648*, 140-153.
- Silva-Adaya, D., Perez-De La Cruz, V., Villeda-Hernandez, J., Carrillo-Mora, P., Gonzalez-Herrera, I. G., Garcia, E., . . . Santamaria, A. (2011). Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurenate as a protective strategy. *Neurotoxicol Teratol*, *33*(2), 303-312. doi: 10.1016/j.ntt.2010.10.002

- Smith, Q. R., Momma, S., Aoyagi, M., & Rapoport, S. I. (1987). Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem*, *49*(5), 1651-1658.
- Soneja, A., Drews, M., & Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep*, *57 Suppl*, 108-119.
- Stone, T. W. (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*, *45*(3), 309-379.
- Thomas, S. R., Mohr, D., & Stocker, R. (1994). Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*, *269*(20), 14457-14464.
- Triggs, W. J., & Willmore, L. J. (1984). In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J Neurochem*, *42*(4), 976-980.
- Turski, W. A., Nakamura, M., Todd, W. P., Carpenter, B. K., Whetsell, W. O., Jr., & Schwarcz, R. (1988). Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. *Brain Res*, *454*(1-2), 164-169.
- Vamos, E., Pardutz, A., Klivenyi, P., Toldi, J., & Vecsei, L. (2009). The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci*, *283*(1-2), 21-27. doi: 10.1016/j.jns.2009.02.326
- Wang, X. D., Notarangelo, F. M., Wang, J. Z., & Schwarcz, R. (2012). Kynurenic acid and 3-hydroxykynurenine production from D-kynurenine in mice. *Brain Res*, *1455*, 1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.026
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, *74*(1), 139-162.
- Zadori, D., Klivenyi, P., Vamos, E., Fulop, F., Toldi, J., & Vecsei, L. (2009). Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm*, *116*(11), 1403-1409. doi: 10.1007/s00702-009-0263-4
- Zsizsik, B. H., R. (1999). Kynurenic acid inhibits hydroxyl radical-induced destruction of 2-deoxyribose. In R. Hardeland (Ed.), *Studies on Antioxidants and their Metabolites*. (pp. 92-94.): Cuvillier, Göttingen.
- Zsizsik, B. H., R. . (1999). Comparative studies on kynurenic, xanthurenic, and quindalic acids as scavengers of hydroxyl and ABTS cation radicals. In R. Hardeland (Ed.), *Studies on Antioxidants and their Metabolites*. (Vol. 82-91): Cuvillier, Göttingen.
- Zsizsik, B. K., & Hardeland, R. (2002). Formation of kynurenic and xanthurenic acids from kynurenine and 3-hydroxykynurenine in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*: role of a novel, oxidative pathway. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, *133*(3), 383-392.