



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE FOXO,
INFLAMACIÓN Y NEUROGENESIS EN HIPOCAMPO DE RATAS
EXPUESTAS A OZONO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

NANCY PATRICIA GÓMEZ CRISÓSTOMO

TUTOR PRINCIPAL: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA U.N.A.M

COMITÉ TUTOR:
DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA U.N.A.M
DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALA, INSTITUTO DE
NEUROBIOLOGÍA JURQUILLA U.N.A.M

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 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.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCION.....	5
ESTRÉS OXIDATIVO.....	5
OZONO Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	6
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
SEÑALIZACIÓN REDOX.....	13
FORKHEAD BOX (Fox) ACTIVADOS POR SEÑALES REDOX.....	15
Subfamilia Forkhead Box “O” (FoxO).....	16
FoxO en la respuesta al estrés oxidativo y la apoptosis.....	19
FoxO y el proceso de neurogénesis.....	20
FoxO en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.....	20
FoxO y la respuesta inmune.....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVO GENERAL.....	24
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
5.1 Exposición a Ozono.....	27
5.2 Determinación de Proteínas Oxidadas.....	28
5.3 Técnica de Inmunohistoquímica.....	29
5.4 Western Blot.....	31
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1 Determinación de proteínas oxidadas.....	33
6.2 Activación de FoxO1a.....	34
6.3 Activación de FoxO3a.....	36
6.4 Determinación de ciclina D2.....	38
6.5 Determinación de doblecortina (Dcx).....	40
6.6 Determinación de caspasa 3 activa.....	41
6.7 Determinación de SOD Mn.....	43
6.8 Determinación de FoxP3.....	45
6.9 Determinación de IL-1 β	46
6.10 Determinación de IL-10.....	46

6.11 Determinación de IL-17.....	48
7. DISCUSION.....	51
8. CONCLUSIONES.....	60
9. BIBLIOGRAFIA	63

ABREVIATURAS

AKT/PKB: Proteína cinasa específica serina-treonina/Proteína cinasa B	JNK: C-Jun N-terminal
AP-1: Proteína de activación 1	MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno
ARE: Elementos de respuesta antioxidante.	NF κ B: Factor nuclear κ B
ATC: Ácido tricloroacético	NO: Óxido nítrico
BHE: Barrera hematoencefálica	NOS: Óxido nítrico sintasa
CAT: Catalasa	NOx: Óxidos de nitrógeno
CD2: Ciclina D2	NrF2: Factor nuclear relacionado al factor eritroide 2
CO: Monóxido de carbono	NSC: Células madre neurales adultas
COV: Compuestos orgánicos volátiles	OMS: Organización Mundial de la Salud
DNPH: Dinitrofenilhidralazina	p.p.m: Partes por millón
EA: Enfermedad de Alzheimer	p53: Proteína 53
FKH: Dominio forkhead box	PBS: Solución Buffer Fosfatos
FoxO: Forhead Box subfamilia O	pFoxO: Forhead Box subfamilia O fosforilado
FoxP: Forhead Box subfamilia P	PI3K: Fosfo-inositol 3 cinasa
GPx: Glutación peroxidasa	Prx: Peroxirredoxina
GR: Glutación reductasa	RL: Radicales Libres
IGF: Factor de crecimiento tipo insulínico	ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
IL-10: Interleucina 10	SNC: Sistema Nervioso Central
IL-17: Interleucina 17	SOD Mn: Superóxido dismutasa de manganeso
IL-17R: Receptor de interleucina 17	Trx: Tiorredoxina
IL-1 β : Interleucina 1 β	
IL-2R: Receptor de interleucina 2	

RESUMEN

La contaminación ambiental es considerada un factor de riesgo importante en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad de Alzheimer. El ozono es uno de los componentes de la contaminación fotoquímica del aire. Este gas posee propiedades altamente oxidantes y dentro de sus efectos está la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres (RL); por ello, la contaminación ambiental está involucrada en el desarrollo de enfermedades que presentan un importante desequilibrio redox. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo murino de neurodegeneración causado por estrés oxidativo crónico el cual es producido por la exposición crónica a bajas dosis de ozono. METODOEl objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la exposición crónica a bajas dosis de ozono sobre los factores de transcripción FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3 en hipocampo de ratas expuestas a este gas. Poner todo lo medido Los resultados muestran que FoxO 1a y FoxO 3a se activaron, así como FoxP 3 aumentó su expresión, debido a un aumento en las ROS generadas por la exposición crónica a bajas dosis de ozono. Los resultados también indican que la activación de FoxO 1a no produjo una disminución de la ciclina D2; pero en presencia del estado de estrés oxidativo, encontramos un aumento de la ciclina D2 acompañado de un incremento de la activación de la caspasa 3, en neuronas de hipocampo de ratas expuestas a ozono. Los resultados indican que el aumento de estrés oxidativo causa un aumento de FoxO 3a y éste se refleja en un aumento en la expresión de la superóxido dismutasa de manganeso (SOD Mn). Por otra parte,

se muestra que el aumento en la expresión de FoxP 3 inducido por estrés oxidativo causó un aumento en la expresión de la interleucina 17 (IL-17), esto se asocia con un incremento de la interleucina 1 β (IL-1 β) y un decremento de la interleucina 10 (IL-10).

Finalmente, con los resultados obtenidos podemos concluir que la exposición crónica a bajas dosis de ozono fue capaz de inducir un estado de estrés oxidativo, el cual indujo la activación de los factores de transcripción FoxO 1a y FoxO 3a, así como un aumento en la expresión de FoxP 3. Esto se refleja en un aumento en la muerte neuronal, un aumento de la SOD Mn y pérdida de la regulación de la respuesta Th1, Th2 y T17. Durante un equilibrio redox, estos factores participan en la regulación de procesos celulares que permiten mantener la homeostasis; sin embargo, bajo un estado de estrés oxidativo no son capaces de regular estos procesos.

ABSTRACT

Environmental pollution is considered a risk factor in the development of several chronic degenerative diseases such as cancer, cardiovascular diseases and Alzheimer's disease. Ozone is one of the photochemical component of the air pollution. This gas has highly oxidizing properties and its effect is the generation of reactive oxygen species (ROS) and free radicals (FR); therefore, environmental pollution is involved in the development of many diseases that have a significant redox imbalance. Our working group has developed a murine model of neurodegeneration by chronic oxidative stress caused by chronic exposure to low doses of ozone. The aim of this work was to determine the effect of chronic exposure to low doses of ozone on the forhead Box transcription factors, FoxO 1a, 3a and FoxO FOXP 3 in hippocampus of rats exposed of this gas. The results showed that FoxO 1a and 3a is activated FoxO and FOXP 3 expression increased due to an increase in ROS caused by chronic exposure to low doses of ozone. The results also indicated that the activation of FoxO 1a did not produce a decreased cyclin D2 but in the presence of oxidative stress condition found an increase in cyclin D2 related with increased activation of caspase 3, in hippocampi neurons of rats exposed to ozone. The results indicate that increased oxidative stress caused increased FoxO 3a and this is reflected in an increase in the expression of the manganese superoxide dismutase (SOD Mn). Furthermore is shown that the increased expression of FOXP 3 induced oxidative stress caused an increase in the expression of interleukin 17 (IL-17), this is associated with a gradual increase of interleukin 1 β (IL-1 β) and a decrease in interleukin 10 (IL-10).

Finally the result obtained shown that chronic exposure to low doses of ozone was able to induce a state of oxidative stress, which induced activation of FoxO transcription factors 1a and FoxO 3a, and an increase in the expression of FOXP 3 which reflected in an increase in neuronal cell death, an increase in Mn SOD and the loss of the regulation of Th1, Th2 and T17 response. For a redox balance, these factors are involved in regulation of cellular processes to maintain homeostasis, but in a state of oxidative stress are able to regulate these processes.

1. INTRODUCCION

ESTRÉS OXIDATIVO

El equilibrio entre la producción de moléculas pro-oxidantes y la capacidad de las defensas antioxidantes para contrarrestar los efectos de los RL en los sistemas biológicos, se conoce como balance de óxido-reducción o balance redox, el cual en condiciones fisiológicas puede activar vías de señalización con el objetivo de mantener la homeostasis celular (Valko, Leibfritz et al. 2007). Un aumento significativo de los RL durante un tiempo prolongado puede conducir a una pérdida de este equilibrio redox, el cual es definido comúnmente como estrés oxidativo. Durante el estado crónico de estrés oxidativo, ocurren alteraciones de las funciones celulares tales como la disfunción mitocondrial, la activación de la apoptosis, el bloqueo en la diferenciación celular y la activación desordenada del ciclo celular. De acuerdo con diversos reportes, este estado de estrés oxidativo crónico se encuentra presente en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Uttara, Singh et al. 2009).

Los RL son especies químicas pro-oxidantes, que se caracterizan por contener uno o más electrones desapareados y causar la oxidación de otras moléculas. Los RL más comunes en la fisiología celular son los derivados del oxígeno (O_2), los cuales dan origen a las ROS, dentro de las que destacan el radical hidroxilo ($OH\bullet$), el radical superóxido ($O_2\bullet^-$), el óxido nítrico ($NO\bullet$) y otras

especies reactivas que aunque no son un radical también son capaces de causar daño; tal es el caso del peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Un incremento crónico y significativo en la producción de RL genera estrés oxidativo y produce daño celular irreversible, ya que éstos son capaces de oxidar biomoléculas como: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Las células pueden prevenir el daño generado por las ROS gracias a que poseen sistemas antioxidantes, integrados por un grupo de enzimas y moléculas encargadas de frenar la acción de estas especies reactivas. Las enzimas que conforman los sistemas antioxidantes endógenos de las células son la superóxido dismutasa de Cobre-Zinc (SOD Cu/Zn) y de Manganeseo (SOD Mn), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPx), las tioredoxinas (Trx) y las peroxirredoxinas (Prx). También existen moléculas con función antioxidante como el glutatión, la arginina, la taurina, la citrulina y la creatinina. Los sistemas antioxidantes exógenos están compuestos por sustancias que se ingieren en la dieta como el zinc y las vitaminas A, C y E, así como los flavonoides y los polifenoles (Arts and Hollman 2005, Valko, Leibfritz et al. 2007).

OZONO Y ESTRÉS OXIDATIVO

Es ampliamente conocido que las ROS pueden ser generadas mediante dos vías, una endógena y otra exógena. En la vía endógena se producen principalmente como resultado del metabolismo aeróbico que tiene lugar en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria; sin embargo,

también en el retículo endoplásmico y en otros organelos celulares, tales como los peroxisomas. Por otra parte, en la vía exógena se producen como resultado de la exposición a diversos factores ambientales, entre los que destacan la radiación ionizante, la exposición a metales, el contacto con pesticidas, el tabaquismo y la contaminación ambiental (Figura 1.1).

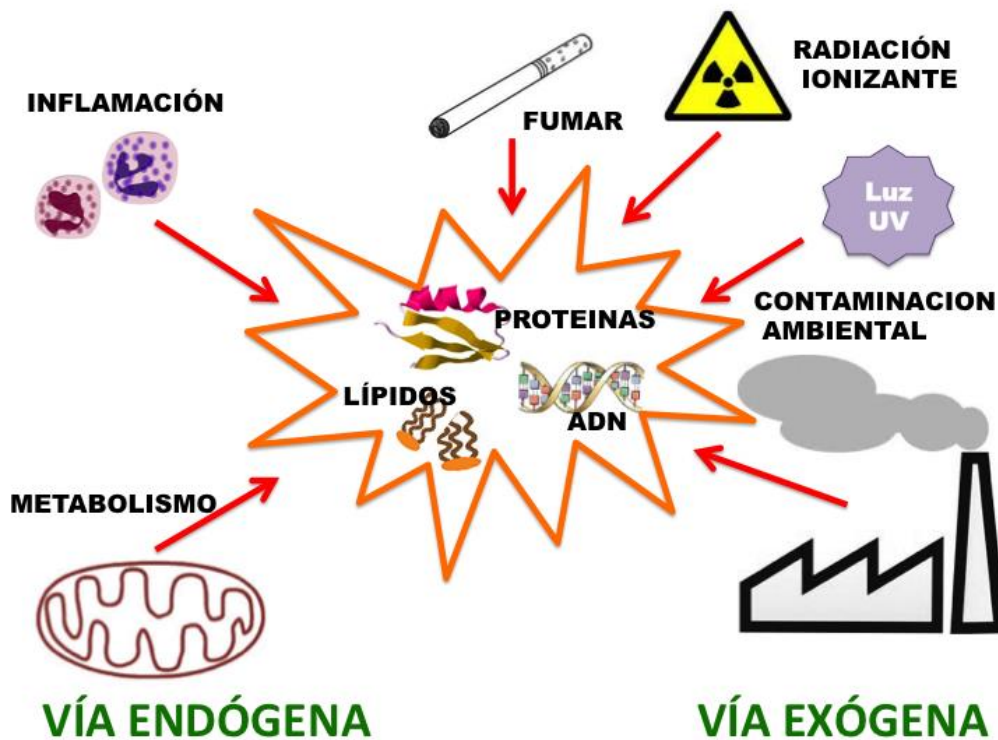


Figura 1.1. Formación de radicales libres.

El crecimiento de las grandes ciudades ha generado un incremento importante en la emisión de diferentes contaminantes ambientales como el dióxido y el monóxido de carbono, los óxido de nitrógeno y azufre, así como los compuestos orgánicos volátiles. La exposición a estos contaminantes se ha asociado con un aumento en la morbi-mortalidad a nivel mundial, por lo que la contaminación ambiental se considera un serio problema de salud pública. La

Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la contaminación del aire es responsable de más de 3 millones de muertes prematuras cada año (Mills, Donaldson et al. 2009).

El ozono es uno de los principales productos de la contaminación fotoquímica del aire, bajo el efecto de la radiación solar, a partir de precursores emitidos por fuentes naturales y actividades humanas como: los óxidos de nitrógeno (NO_x), los compuestos orgánicos volátiles (COV) y el monóxido de carbono (CO) (Figura 1.2) (Valacchi, Weber et al. 2000). Este gas tiene propiedades altamente oxidantes y sus efectos dependen de la dosis y el tiempo de exposición. Por ejemplo, la exposición aguda a niveles elevados de ozono promueve la formación de ROS y puede estimular la síntesis de enzimas antioxidantes con el fin de revertir el estrés oxidativo; por esta razón también se han utilizado altas dosis de ozono con fines terapéuticos contra enfermedades que presentan un importante desequilibrio redox. Estos tratamientos pueden ser efectivos siempre y cuando el paciente posea una gran capacidad antioxidante. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la exposición crónica a bajas dosis de este gas, induce cambios en el estado de estrés oxidativo en diferentes sistemas del organismo y de esta manera participa en el desarrollo de diversas enfermedades crónico degenerativas como cáncer, enfermedades pulmonares, alteraciones cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Singh, Kaur et al. 2007).

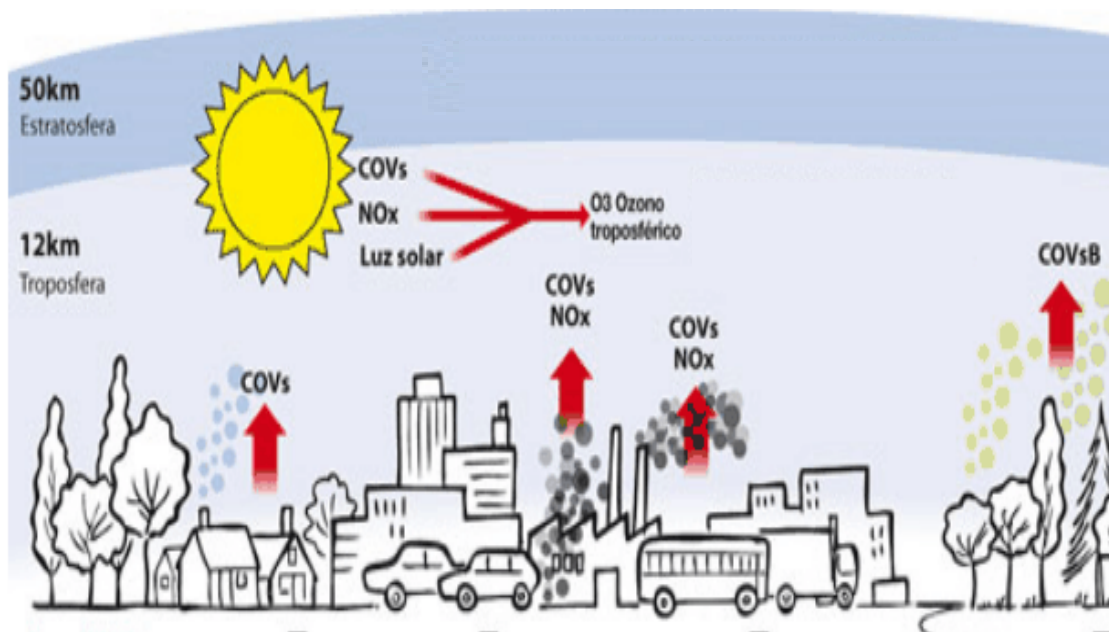


Figura 1.2. Generación de ozono a partir de precursores naturales y productos de actividades humanas. Óxidos de nitrógeno (NOx), compuestos orgánicos volátiles (COV) y monóxido de carbono (CO).

El ozono al ser un gas entra por los receptores del epitelio nasal del bulbo olfatorio; y como consecuencia de la interacción de este gas con los receptores se forman ROS. Ya que estos receptores tienen una comunicación directa con el sistema nervioso central (SNC), permiten el libre acceso de las ROS hacia el tejido cerebral y causan daño por un aumento del estrés oxidativo (Valavanidis, Fiotakis et al. 2008). La otra vía de entrada del ozono es el sistema respiratorio a través de sus vías de conducción y de intercambio (árbol respiratorio y sacos alveolares), donde se forman RL y ROS secundarios a la exposición a este gas que pasan hacia el torrente sanguíneo; lo que promueve la diseminación de éstos por todo el organismo (Bromberg and Koren 1995).

Efectos del ozono en el sistema respiratorio:

Mellick y cols. (1975) describieron cambios importantes en el parénquima pulmonar de ratas Sprague-Dawley y monos Rhesus expuestos a altas dosis de ozono por periodos cortos de tiempo. En sus resultados, ellos mostraron alteraciones en la morfología de los alveolos terminales, con aparente sustitución de los neumocitos tipo I por células epiteliales, acompañado de un incremento en la cantidad de macrófagos e infiltración linfocitaria, lo cual demuestra el desarrollo de un proceso inflamatorio. Adicionalmente se observó un incremento en la cantidad de enzimas antioxidantes en el tejido pulmonar. Otros autores también han demostrado que la inhalación de ozono induce cambios en el tracto respiratorio y el desarrollo de un proceso inflamatorio sistémico (Henrotin, Besancenot et al. 2007).

Efectos del ozono en el SNC:

Algunos investigadores han realizado trabajos que muestran los efectos deletéreos del ozono en diversas poblaciones celulares del SNC. Sin embargo independientemente de la vía de entrada y de la capacidad de este gas para formar las ROS en el tejido cerebral, se ha reportado no solo daño local o muerte neuronal, sino también trastornos en el comportamiento, la conducta motora, el sueño, la memoria y el aprendizaje (Rivas-Manzano and Paz 1999; Santucci, Sorace et al. 2006; Gonzalez-Pina, Escalante-Membrillo et al. 2008). González-Piña y cols. (2008) reportaron que la exposición prenatal a ozono genera una disrupción del sistema monoaminérgico en el cerebelo; otros trabajos han demostrado que también induce un daño permanente en diversas

regiones del mismo, así como alteraciones en la expresión de factores de crecimiento nervioso e inhibición en la expresión de enzimas cruciales para la síntesis de neurotransmisores (Gonzalez-Pina, Escalante-Membrillo et al. 2008). Aunque muchos estudios han puesto en evidencia el daño que se genera en el SNC tras la exposición a ozono, aun no se conoce con certeza el mecanismo mediante el cual induce sus efectos. Se ha propuesto que el daño se genera indirectamente por el desarrollo de un proceso inflamatorio desencadenado en la circulación sistémica después de la exposición al ozono, lo que induce la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) y por consecuencia un daño neuronal. Rivas-Arancibia y cols. (2010) demostraron en múltiples trabajos que ratas expuestas a bajas dosis de ozono durante tiempos prolongados, muestran un incremento significativo en la oxidación de lípidos y proteínas en el tejido cerebral, así como la presencia de daño neuronal irreversible que provoca alteraciones en procesos de neurogénesis, neuroinflamación y modificación de la BHE (Martinez-Canabal, Angoa-Perez et al. 2008; Rivas-Arancibia, Guevara-Guzman et al. 2010; Santiago-Lopez, Bautista-Martinez et al. 2010).

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de padecimientos crónico-degenerativos generados por la acumulación de proteínas oligoméricas e insolubles en regiones específicas del sistema nervioso (Uttara, Singh et al. 2009). El depósito anormal de estas proteínas mal plegadas induce la producción de RL, provocando un estado de estrés oxidativo y generando un

círculo vicioso, pues a su vez estos radicales libres generan una mayor agregación de estas proteínas (Skovronsky, Lee et al. 2006). Este incremento en la producción de RL también promueve la excitotoxicidad y la liberación de mediadores inflamatorios, generando una alteración crónica, progresiva e irreversible.

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la acumulación de la proteína Beta Amiloide en forma de placas neuríticas y la agregación de la proteína Tau hiperfosforilada en forma de marañas neurofibrilares, que en su conjunto provocan alteraciones funcionales en la corteza entorrinal y en el hipocampo (Zhu, Lee et al. 2007; Bondareff 2013). En la enfermedad de Parkinson se observa la acumulación de la proteína alfa-sinucleína formando los cuerpos de Lewy, que provocan daños principalmente a las neuronas de la sustancia nigra, lo cual produce alteración en las funciones motoras y cognitivas (Wood-Kaczmar, Gandhi et al. 2006). Sin embargo, varias enfermedades neurodegenerativas comparten en mayor o menor grado la presencia de estas proteínas mal plegadas. Existen muchas evidencias de que el SNC es altamente sensible al incremento de moléculas pro-oxidantes, debido a su alto contenido de fosfolípidos con cadenas insaturadas, su alta tasa metabólica y su bajo contenido de sistemas antioxidantes; siendo el hipocampo, la sustancia nigra y el cuerpo estriado las estructuras cerebrales más sensibles al estrés oxidativo (Rivas-Arancibia, Guevara-Guzman et al. 2010, Santiago-Lopez, Bautista-Martinez et al. 2010). El estado de estrés oxidativo es considerado un factor determinante en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, pues se ha demostrado que el aumento de

las ROS causa alteraciones en diferentes vías de señalización celular (Manolopoulos, Klotz et al. 2010). Reportes recientes muestran que pacientes con EA, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica presentan alteración en múltiples marcadores de estrés oxidativo (REF).

Boll y cols. (2008) analizaron varios marcadores de estrés oxidativo, como proteínas y lípidos oxidados, así como la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD Cu/Zn y la ferroxidasa, en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con cuatro enfermedades neurodegenerativas diferentes (EA; enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica). Sus resultados muestran un incremento significativo en la cantidad de nitratos y nitritos, así como en la cantidad de lípidos peroxidados; además de una disminución tanto en la cantidad de enzimas antioxidantes como en la actividad de la SOD Cu/Zn y la ferroxidasa. También muestran un incremento en la acumulación de metales como hierro y cobre en las muestras de líquido cefalorraquídeo. Con todos estos resultados ellos proponen la determinación de la actividad de estas enzimas, así como la deposición de hierro y cobre como biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas (Boll, Alcaraz-Zubeldia et al. 2008).

SEÑALIZACIÓN REDOX

Las ROS participan de forma importante en diversas funciones celulares que tienen como objetivo el mantenimiento de la homeostasis celular. Existen

múltiples vías de señalización tales como la supervivencia, la proliferación y la apoptosis, que durante el equilibrio de óxido-reducción responden a señales oxidativas. Dentro de estas vías se encuentran las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la tirosina cinasas y otras serín treonín cinasas (Akt, ERK, JNK) que son activadas por las ROS y fosforilan proteínas implicadas en cascadas de señalización que a su vez, promueven la translocación nuclear de varios factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF κ B), la proteína de activación 1 (AP-1), la proteína 53 (p53), el factor nuclear relacionado al factor eritroide 2 (Nrf2), los elementos de respuesta antioxidante (ARE) y los Forkhead Box (Fox) (Singh, Kaur et al. 2007, Rubio, Valverde et al. 2010).

También se ha demostrado la participación del óxido nítrico (NO•), un radical libre generado por la actividad de las óxido nítrico sintasas (NOS) específicas, principalmente su forma inducible (iNOS) en respuesta a cambios en el balance redox. El NO participa en muchos procesos fisiológicos como la neurotransmisión, la regulación de la presión arterial mediante la relajación de las células del músculo liso y la regulación de la respuesta inmune (Bergendi 1999). Diversos trabajos han demostrado que el aumento de las ROS, es característico durante el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas; pues éstas inducen un aumento en la respuesta inflamatoria en el tejido cerebral y lo que lleva al proceso de nitración de proteínas aumentando así el proceso de neurodegeneración (Chabrier, Demerle-Pallardy et al. 1999).

Finalmente, es importante destacar la participación de los Fox durante el desarrollo del estrés oxidativo, ya que es ampliamente conocido que estos

factores de transcripción responden eficazmente a cambios oxidativos y desempeñan un papel muy importante tanto en la señalización para la supervivencia mediante la regulación del ciclo celular, como en la respuesta al estrés oxidativo a través de la regulación de sistemas antioxidantes (Putker, Madl et al. 2013).

FORKHEAD BOX (Fox) ACTIVADOS POR SEÑALES REDOX

Existen factores de transcripción activados por señales oxidantes, entre los que destacan los Forkhead Box (Fox), capaces de regular diversas funciones biológicas tales como la diferenciación, la proliferación, la resistencia al estrés, la longevidad y la supervivencia (van der Horst and Burgering 2007). Estos factores de transcripción son una superfamilia de proteínas que modulan la expresión de genes involucrados en procesos celulares como el ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo, el estrés oxidativo y el crecimiento celular, entre otros. Son proteínas altamente conservadas y se agrupan en subfamilias de acuerdo a sus características transcripcionales.

Dentro de sus características estructurales destaca la presencia de una región de unión a DNA altamente conservada, de aproximadamente 100 aminoácidos, la cual es denominada “alas de hélice”, “dominio forkhead box (FKH)” o “motivo de unión a DNA”, la secuencia de esta región es útil para su clasificación en subfamilias (Figura 1.3). En el año 2000 se estableció la nomenclatura para esta familia de factores de transcripción, compuesta por la raíz Fox (Forkhead Box) para identificar a todos aquellos genes ortólogos en las diferentes especies, además de la adición de una letra que identifica a las subfamilias

(desde FoxA hasta FoxS) y finalmente se asigna un número para cada uno de los integrantes de las subfamilias, por ejemplo FoxJ 1, FoxP 3, FoxN 1, etc (Kaestner, Knochel et al. 2000).

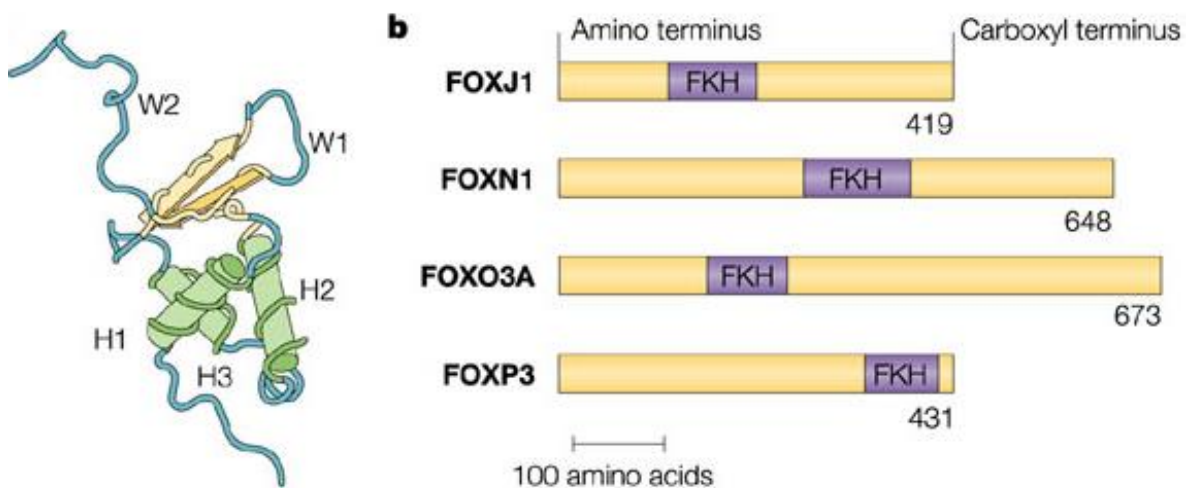


Figura 1.3. Representación de los dominios de unión a DNA de los factores de transcripción Forkhead. a) Estructura tridimensional del dominio FKH, b) representación esquemática del dominio FKH de diferentes subfamilias de Fox (Nature Reviews Immunology 4, 889-899. 2004)

Subfamilia Forkhead Box “O” (FoxO)

La subfamilia Forkhead O (FoxO) está integrada por 4 miembros: FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6 que están implicados en la regulación del metabolismo, la proliferación celular, la resistencia al estrés oxidativo, la regulación del sistema inmune y la apoptosis (de Keizer, Burgering et al. 2011).

Esta subfamilia de factores de transcripción contiene un dominio de unión a DNA de 5 aminoácidos que interacciona específicamente con distintos blancos dentro del genoma a través de uno de los elementos de respuesta a insulina. En general, la activación de los FoxO es capaz de controlar el incremento de las ROS mediante la regulación de un grupo de genes asociados a la transcripción de enzimas antioxidantes como la SOD Mn, la catalasa (CAT) y las peroxirredoxinas (Prx); por lo que se considera que los FoxO son el centro de la señalización redox celular. Los ratones knockout para cada uno de los integrantes de esta subfamilia desarrollan diferentes fenotipos, lo cual sugiere que cada uno de estos miembros tiene una función específica ante el incremento de las ROS. Posiblemente esto se debe a la vía que promueve su activación y su interacción con diferentes co-factores. Se demostró que los FoxO pueden ser activados por factores de crecimiento de tipo insulínico (IGF) o mediante modificaciones post-traduccionales como fosforilación, metilación y ubiquitinación; regulando posteriormente la expresión de genes que modulan el estrés oxidativo (Dansen 2011).

Sin embargo su activación no siempre induce su actividad transcripcional. La activación de estos factores de transcripción a través del IGF desencadena la activación de la proteína cinasa B/proteína cinasa específica serina/treonina (AKT/PKB) y por consecuencia la activación de la enzima Fosfo-inositol 3 cinasa (PI3K), lo cual conduce a la unión de la proteína adaptadora 14-3-3 con FoxO. Como resultado de esta unión, el factor de transcripción es exportado del núcleo hacia el citoplasma interrumpiendo su actividad transcripcional. FoxO es regulado positivamente por la cinasa C-Jun N-terminal (JNK), ya que

ésta fosforila a FoxO en sitios específicos y promueve su translocación al núcleo para que comience su actividad transcripcional, por lo que JNK antagoniza la activación de AKT/PKB (Figura 1.4). Debido a que muchas de las funciones de estos factores de transcripción parecen ser redundantes, se han realizado diversas investigaciones con el fin de conocer mejor la forma en que se integra esta sofisticada red de señales opuestas, para dar lugar a una respuesta particular de FoxO. La respuesta de FoxO depende de la vía de señalización que lo active y del sitio de fosforilación, metilación o ubiquitinación (Figura 1.5) (Cao, Zhu et al. 2013, Putker, Madl et al. 2013).

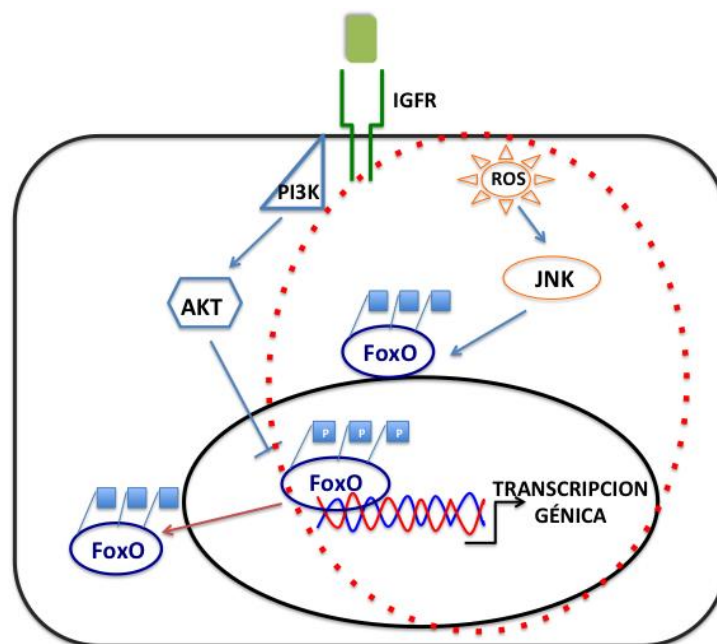


Figura 1.4. Representación esquemática de la activación de FoxO. La señalización inducida por receptores de crecimiento tipo insulínico (IGF I) a través de la vía de AKT/PKB regula negativamente la actividad transcripcional (INHIBITORIA), mientras que la activación por estrés oxidativo mediante la vía de JNK induce su actividad transcripcional (ACTIVADORA) (Líneas punteadas).

FoxO en la respuesta al estrés oxidativo y la apoptosis

Como se mencionó anteriormente FoxO controla el incremento de ROS a través de la regulación transcripcional de enzimas como la MnSOD, la CAT y la Prx. La participación de estos factores de transcripción en la resistencia al estrés oxidativo consiste en la fosforilación de FoxO 3a en sitios específicos para su activación. Esta modificación postranscripcional es inducida por JNK, que a su vez es activada por el incremento de ROS, lo cual desencadena una cascada de señalización que culmina con el aumento en la transcripción de proteínas antioxidantes. Por otro lado, la fosforilación de otros sitios de FoxO 3a también se ha ligado a la activación de la vía apoptótica mediante la regulación en la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bim, PUMA o proteínas anti-apoptóticas como FLIP (Figura 1.6).

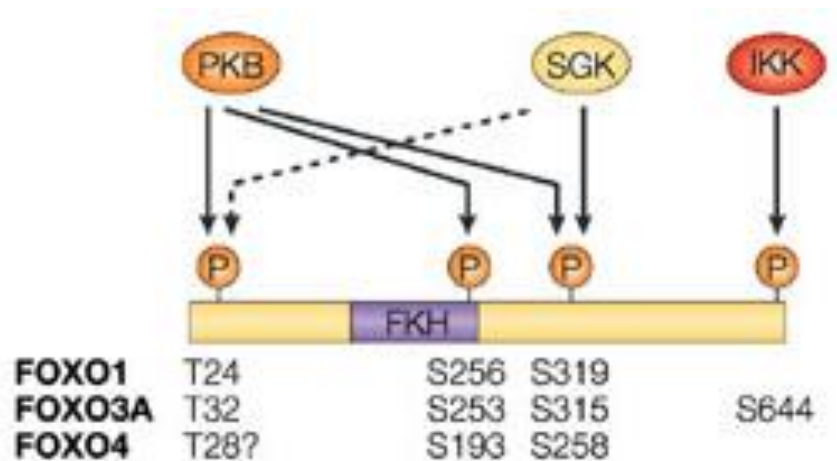


Figura 1.5. Sitios de fosforilación de los factores de transcripción ForkheadBox.

PKB: proteína cinasa B; SGK: ;IKK: .(Tomada de Nature Reviews Immunology 2004)

FoxO y el proceso de neurogénesis

Recientes investigaciones han demostrado la participación de FoxO en la regulación de las células madre neurales adultas (NSC). La pérdida de factores de transcripción FoxO provoca un aumento prematuro de la neurogénesis durante el desarrollo del SNC y una disminución en la diferenciación de las células. La delección de FoxO3 en ratones conduce a una depleción prematura de las NSC, lo que se ha asociado con una función reguladora de este factor de transcripción durante la supervivencia y la longevidad. Aún no se conoce con exactitud el papel que desempeña FoxO3 en el mantenimiento de las NSC (Webb, Pollina et al. 2013).

FoxO en la regulación del ciclo celular y la apoptosis

FoxO1a juega un papel importante en la regulación del metabolismo y las vías relacionadas con la gluconeogénesis y la glucogenólisis, ya que se encuentra ligado al promotor de la glucosa-6-fosfatasa y la fosfoenol-piruvato-carboxi-cinasa; sin embargo, también se ha demostrado su participación en la regulación del ciclo celular pues actúa como un regulador en la transición G1/S al modular la expresión de la ciclina D (Schmidt, Fernandez de Mattos et al. 2002, Stahl, Dijkers et al. 2002).

FoxO y la respuesta inmune

Diversos estudios han demostrado la participación de FoxO en la función de los linfocitos y su estrecha participación en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune. Se ha demostrado que varios receptores de los linfocitos TCD28+ y linfocitos B, así como el receptor de la interleucina 2 (IL-2R) bloquean la función de FoxO mediante la activación de IP3/PKB (Xia and Zhu 2013, Zhao, Lu et al. 2013). Al igual que ocurre en otros tejidos la función de FoxO en linfocitos T naive y pro-linfocitos B es mantener la supervivencia de estas estirpes celulares a través de la inducción en la expresión del receptor de interleucina 17 (IL-17R) (Peng 2008). Sin embargo, no solo la subfamilia FoxO está involucrada en la respuesta inmune, pues múltiples trabajos han demostrado que un integrante de la subfamilia FoxP juega un papel importante en la regulación inmune a través de la expresión de FoxP 3 en los linfocitos T reguladores, astrocitos y microglía. Este factor de transcripción es crucial para la generación de células T reguladoras y el mantenimiento de la tolerancia inmune. Recientes estudios revelan la importancia de la respuesta Th17 en la regulación de la respuesta inmune y su participación en las enfermedades autoinmunes, pues han demostrado que ratones knockout para FoxP 3 desarrollan enfermedades autoinmunes . Esta respuesta Th17 está determinada por la secreción de IL-17 y por la expresión de FoxP 3 (Aschenbrenner, D'Cruz et al. 2007; Cirocco, Carreno et al. 2007).

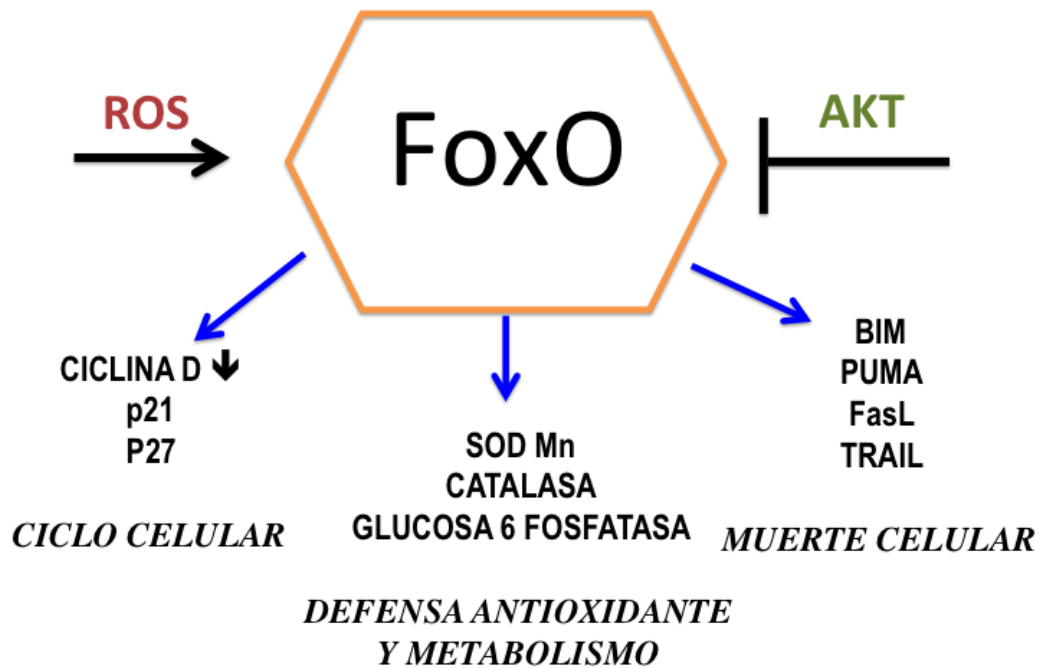


Figura 1.6. Participación de los Forkhead box O en múltiples procesos biológicos.

Nuestro grupo de trabajo ha generado un modelo murino de estrés oxidativo, el cual desarrolla un proceso neurodegenerativo crónico y progresivo como resultado de la exposición crónica a bajas dosis de ozono. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la exposición crónica a ozono sobre los cambios en la señalización a través de los factores de transcripción FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3.

2. JUSTIFICACIÓN

En las enfermedades neurodegenerativas, el bloqueo del proceso de neurogénesis, el estado de estrés oxidativo y la pérdida de la regulación de la respuesta inflamatoria, son eventos cruciales para perpetuar el daño celular.

Con este estudio se pretende dilucidar la participación de tres factores de transcripción que pertenecen a la familia de los Forkhead Box (FoxO 1a, FoxO 3a, FoxP 3) en los procesos de ciclo celular, neurogénesis, respuesta al estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en un modelo de estrés oxidativo y daño neurodegenerativo.

3. HIPÓTESIS

Si el estrés oxidativo inducido por la exposición crónica a ozono promueve la activación de FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3, entonces podremos observar una disminución en los niveles de ciclina D2, alteración en la neurogénesis, un aumento de la SOD Mn y una pérdida de la regulación en la respuesta inflamatoria, en el hipocampo de ratas.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del estrés oxidativo crónico inducido por la exposición a bajas dosis de ozono sobre la señalización de FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3, sobre el ciclo celular, la neurogénesis, la expresión de SOD Mn y la respuesta inflamatoria en el hipocampo de ratas.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar que la exposición crónica a dosis bajas de ozono causa estrés oxidativo en el hipocampo de ratas.
- Identificar y cuantificar la expresión del factor de transcripción FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3 en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono.
- Determinar la relación de FoxO 1a y la expresión de ciclina D2 en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono.
- Relacionar la activación de FoxO 1a y la expresión de ciclina D2 con los cambios en el proceso de neurogénesis en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono.
- Determinar la relación entre la expresión de ciclina D2 y la activación de la caspasa 3 en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono.

- Demostrar que se produce la activación de FoxO 3a, y un aumento en los niveles de SOD Mn en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono.
- Evaluar la expresión de FoxP3 y su efecto sobre la expresión de IL-17 en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono. Y correlacionar los cambios obtenidos, con la respuesta Th1 y Th2 a través de la determinación de los niveles de citocinas IL-1 β e IL-10.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 72 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 300 g, las cuales se mantuvieron en cajas de acrílico, con libre acceso a la comida y el agua. Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (n=12 por grupo) y cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos:

- 1) Control (expuesto a aire libre de ozono durante 30 días)
- 2) Exposición a ozono durante 7 días
- 3) Exposición a ozono durante 15 días
- 4) Exposición a ozono durante 30 días
- 5) Exposición a ozono durante 60 días
- 6) Exposición a ozono durante 90 días

Experimentos previos mostraron que en grupos control expuestos a aire sin ozono no existe diferencia estadística entre 7, 15, 30, 60 y 90 días de exposición por lo tanto elegimos como control el grupo expuesto a aire durante 30 días. Cada grupo expuesto a ozono recibió una dosis de 0.25 partes por millón (p.p.m) por 4 h diarias durante el tiempo correspondiente. Dos hs después de concluido cada tratamiento, los animales fueron divididos en dos subgrupos (n=6 por grupo) y anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso). De cada tratamiento se tomó un subgrupo para la obtención del cerebro el cual fue procesado para técnicas histoquímicas. Del otro subgrupo se obtuvo el hipocampo para realizar pruebas de Western Blot. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO- 1999 y las guías de los Institutos Nacionales de Salud (NIH).

5.1 Exposición a Ozono

La exposición a ozono se realizó de acuerdo al método previamente descrito por Rivas-Arancibia et al (2010). Las ratas se colocaron en una cámara de acrílico transparente herméticamente cerrada, la cual tiene un difusor conectado a un generador de ozono de flujo variable (5 litros/segundo). El generador de ozono fue alimentado con flujo de aire, la producción de los niveles de ozono fue proporcional a la intensidad de la corriente utilizada para el flujo de aire en el generador. Los animales se expusieron 4 h diarias a 0.25 p.p.m de ozono durante el periodo asignado para cada tratamiento (7, 15, 30, 60 y 90 días). Los niveles de ozono fueron monitorizados durante todo el experimento con un monitor de ozono (PCI Sistemas de Ozono y Control, West Caldwell, NJ) colocado dentro de la cámara con el fin de corroborar que se mantuviera constante la concentración de ozono. Las ratas control fueron sometidas al mismo protocolo pero con exposición al flujo de aire ambiental en sustitución de ozono. Una vez transcurridas las 4 h de exposición diaria, las ratas fueron devueltas a sus cajas de alojamiento (Figura 5.1).

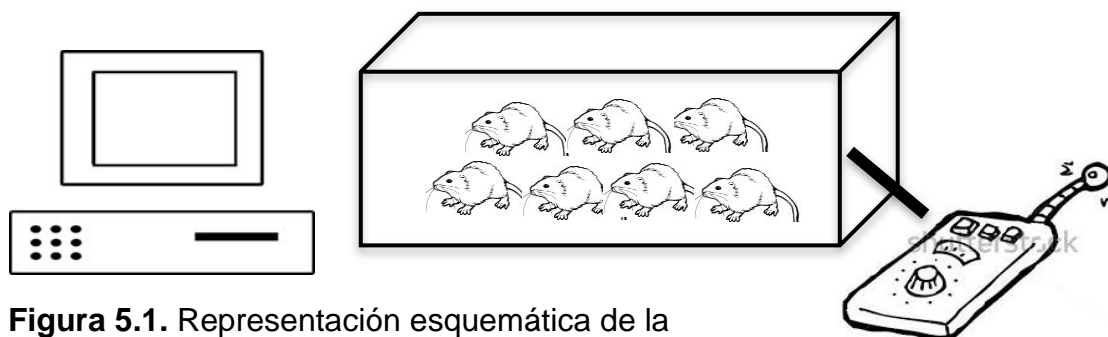


Figura 5.1. Representación esquemática de la generación de ozono y del modelo de exposición a este gas.

5.2 Determinación de Proteínas Oxidadas

Para la determinación de las proteínas oxidadas se realizó el siguiente procedimiento: una vez que los animales fueron anestesiados y sacrificados, se obtuvieron los hipocampos y se colocaron en 50 μ l de buffer de lisis que contenía inhibidores de proteasas (Complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche Applied Science). Posteriormente, cada muestra se homogenizó y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, para eliminar los restos celulares, después se colectó únicamente el sobrenadante. Una vez obtenidas las muestras se realizó la cuantificación de proteína por espectrofotometría utilizando el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). Las proteínas oxidadas fueron determinadas mediante la formación de grupos carbonilo en el tejido de los hipocampos de cada grupo, para ello se utilizó el reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina, 2,4-DNPH). Se tomaron 200 μ l de cada muestra y se añadió 200 μ l de ácido tricloroacético (ATC) al 20% y las muestras se incubaron a 4°C durante 5 min, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm y al precipitado se le añadieron 200 μ l de 2,4-DNPH 10mM en HCl 2 M, se incubó por 30 min a temperatura ambiente con ciclos de agitación de 5 min cada uno. Después se agregaron 200 μ l de ATC 50% y se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó en 3 ocasiones con 5 μ l de solución de etanol: acetato de etilo (1:1). Finalmente, el botón fue resuspendido en guanidina 6 M y se leyó en el espectrofotómetro (Epoch Microplate Spectrophotometer Bio-Teck Instruments, Inc.) a 270 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes y se graficó en nanomoles de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH) por miligramo de proteína.

5.3 Técnica de Inmunohistoquímica

Dos hs después de finalizada la última exposición a ozono, las ratas (n=6 por grupo) fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) y perfundidas por vía transcardial con solución fijadora (paraformaldehído al 4%). El cerebro se disecó y se seccionó de forma sagital en la línea media con ayuda de una matriz de acero inoxidable (Kent Scientific Corporation), obteniendo ambos hemisferios por separado. Posteriormente, se colocaron en la misma solución fijadora durante 24 h más. Una vez concluido el tiempo de fijación, los cerebros fueron procesados para la técnica histológica convencional en parafina, con el siguiente protocolo:

Deshidratación:

Etanol 70%	1 h
Etanol 80%	1 h
Etanol 96% (dos cambios)	1 h un cambio
Etanol absoluto (dos cambios)	1 h un cambio

Aclaramiento:

Xilol (dos cambios)	45 min un cambio
---------------------	------------------

Infiltración:

Parafina líquida (dos cambios)	1 h cada uno
--------------------------------	--------------

Posteriormente, los cerebros fueron embebidos en bloques de parafina (Paraplast, Roche) y se realizaron cortes sagitales de 5 micras de espesor en micrótopo (American Óptica) a nivel del hipocampo, los cuales fueron montados en portaobjetos. Las muestras fueron desparafinadas con Xilol y

rehidratadas al ser colocadas en soluciones porcentuales decrecientes de alcohol (100%, 96%, 80% y 70%). Después se realizaron 2 lavados con agua destilada durante 5 min y se incubaron con recuperador de antígenos (Decloaker, Biocare Medical) en baño maría durante 20 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se lavaron en 2 ocasiones con agua destilada por 5 min. Las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrogeno al 3% (J. T Baker) durante 5 min para inactivar a la peroxidasa endógena y lavadas nuevamente con agua destilada. Posteriormente fueron incubadas con albumina sérica bovina IgG fracción V libre de ácidos grasos (BSA, Sigma) al 2% durante 30 min para el bloqueo de sitios de reconocimiento inespecífico y lavadas en dos ocasiones con PBS (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0.15 M, pH7.4). A continuación, las muestras se trataron con Triton 100X 0.2% en PBS durante 10 min para permeabilizar las membranas y después se enjuagaron nuevamente con PBS. Se incubaron con el anticuerpo primario (conejo anti-FoxO1a, conejo anti-FoxO3a, ratón anti-ciclina D2, conejo anti-caspasa 3, conejo anti-IL-10 ó conejo anti-IL-17) diluido 1:100 durante toda la noche a 4°C, después se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado que correspondiera a cada isotipo del primario utilizando FITC-conjugado, TRITC-conjugado o Streptavidina-conjugado. Las laminillas fueron contra-teñidas con medio de montaje hidrofílico (Vectashield) que contiene DAPI (Vector Labs., CA, EE.UU.) para la tinción de los núcleos. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio LEICA TCS SP5.

5.4 Western Blot

Los hipocampos disecados fueron colectados en buffer de lisis (glicerol al 10%, tritón al 1%, SDS al 10%) que contenía un coctel de inhibidor de proteasas y procesados con ayuda de un homogenizador (Polytron). Posteriormente, fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min para eliminar los restos celulares y se colectó únicamente el sobrenadante. Una vez obtenidas las muestras se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford utilizando reactivo de Bio-Rad protein assay con el protocolo para micro-muestra. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 5X (Tris 0.5 M pH 8.5, SDS al 10%, glicerol al 30%, azul de bromofenol al 0.1%, ditiotreitól 100 mM) e incubadas durante 10 min en baño de agua en ebullición. Posteriormente, las muestras fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10%, transferidas a membrana de polifluoruro de vinilideno PVDF (Immobilon-P Transfer Membranes, Millipore Corporation Bedford, MA, EE.UU) y se bloquearon durante toda la noche con leche descremada al 5% en buffer tris fosfatos/Tween 20 (0.1%). Después, las membranas se incubaron durante toda la noche con anticuerpo primario diluido 1:1000 en el mismo buffer (conejo anti-FoxO1a, conejo anti-FoxO3a, ratón anti-ciclina D2, mouse anti-doblecortina, conejo anti-caspasa 3, conejo anti-SOD Mn, conejo anti-IL-1 β , conejo anti-FoxP3, conejo anti-IL-10, conejo anti-IL-17 y conejo anti-GAPDH), las membranas se lavaron y se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario (1:10000) correspondiente para cada anticuerpo primario (HRP anti-conejo IgG y HRP anti-ratón IgG). La señal se detectó por quimioluminiscencia utilizando Immobilon Wester Chemiluminescent HRP

substrate (Millipore Corporation Bedford, MA, EE.UU). La señal luminosa fue capturada por exposición en películas radiográficas, las cuales fueron reveladas de forma manual.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de Western Blot son presentados como la media \pm error estándar (EEM) y analizados mediante una prueba de Dunnet después de una prueba de ANOVA para evaluar la significancia estadística. El nivel de significancia considerado para este análisis fue $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de proteínas oxidadas

Los resultados muestran un incremento en la cantidad de grupos carbonilo desde los 7 y hasta los 90 días de exposición a ozono con respecto al grupo control. Sin embargo, solo se observa un aumento significativo a los 15, 30 y 60 días de exposición a ozono, siendo más evidente el aumento a los 30 días de tratamiento (Figura 6.1). Demostrando con esto la oxidación de proteínas como efecto de la exposición a los diferentes tiempos de exposición a ozono.

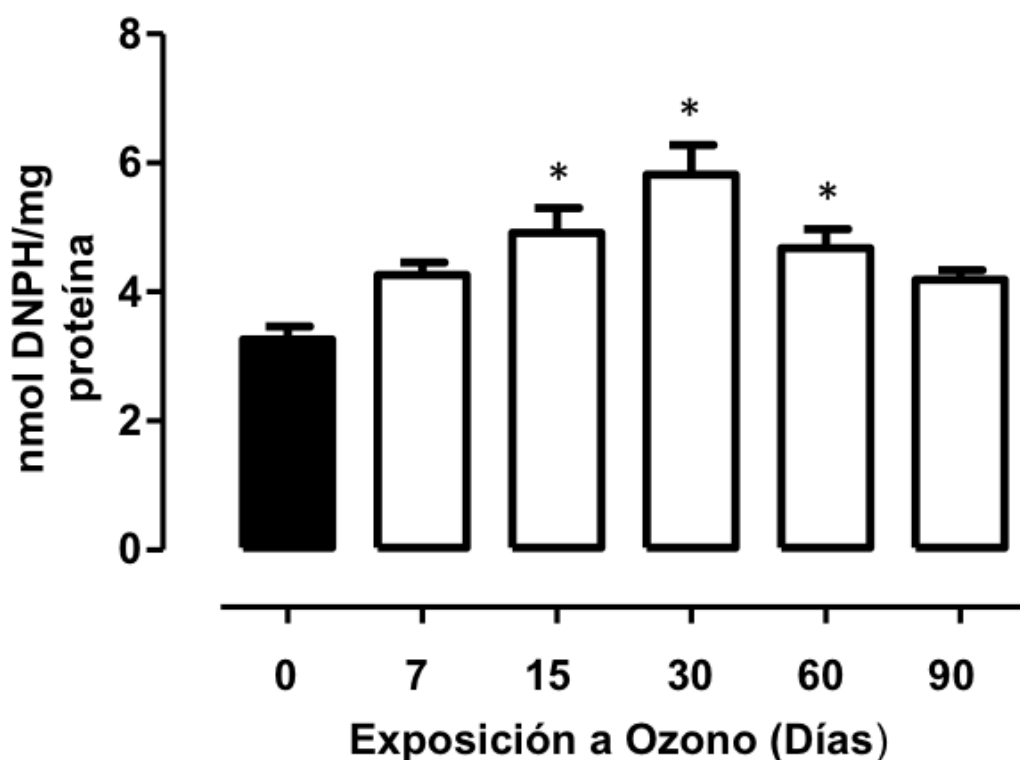


Figura 6.1. Efecto de los diferentes tiempos de exposición a ozono sobre los niveles de grupos carbonilo. Dosis de ozono utilizada 250 p.p.m. Los datos se muestran como la media \pm EEM (* $P < 0.05$).

6.2 Activación de FoxO1a

Se observaron células inmunorreactivas para FoxO1a fosforilado (pFoxO 1a) en los cortes de hipocampo de las ratas (Figura 6.2A), durante todos los tiempos de exposición a ozono; observándose un aumento gradual en la cantidad de células inmunorreactivas, conforme aumenta el tiempo de exposición a ozono.

La determinación de pFoxO 1a mediante Western blot (Figura 6.2B) mostró un incremento significativo a los 15, 30 y hasta los 60 días de exposición a ozono con respecto al grupo control. También se observó un incremento en la determinación de pFoxO1a a los 7 días, sin embargo este no fue significativo, mientras que a los 90 días no se observaron cambios con respecto al grupo control.

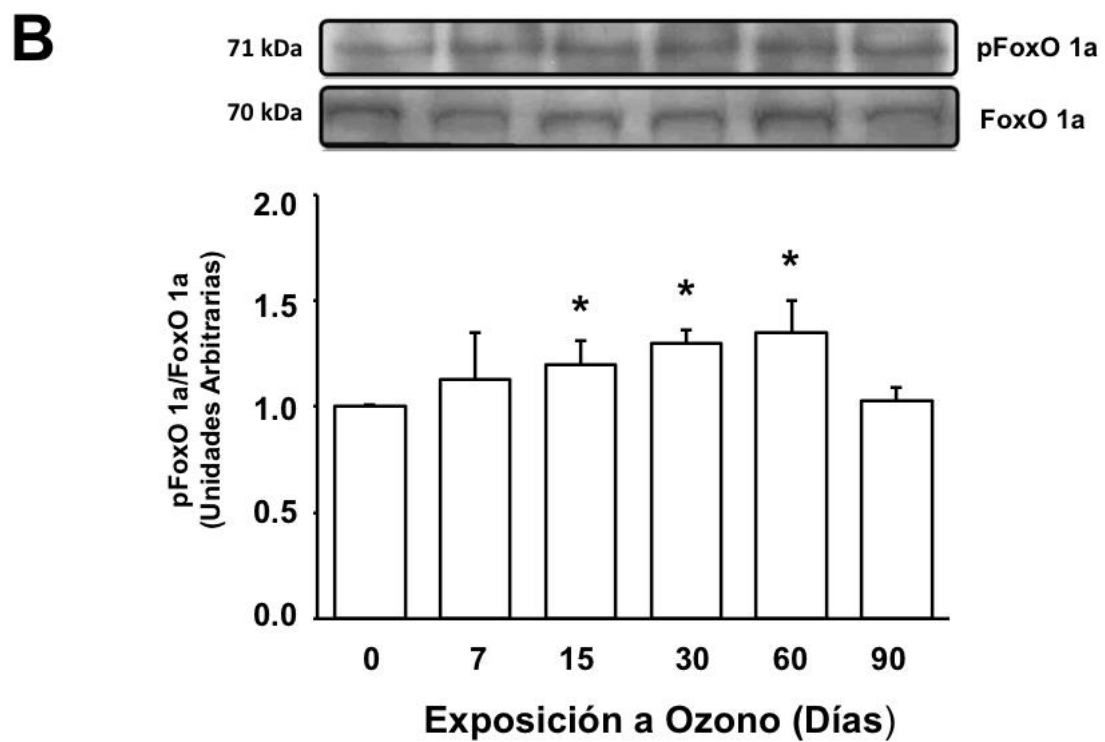
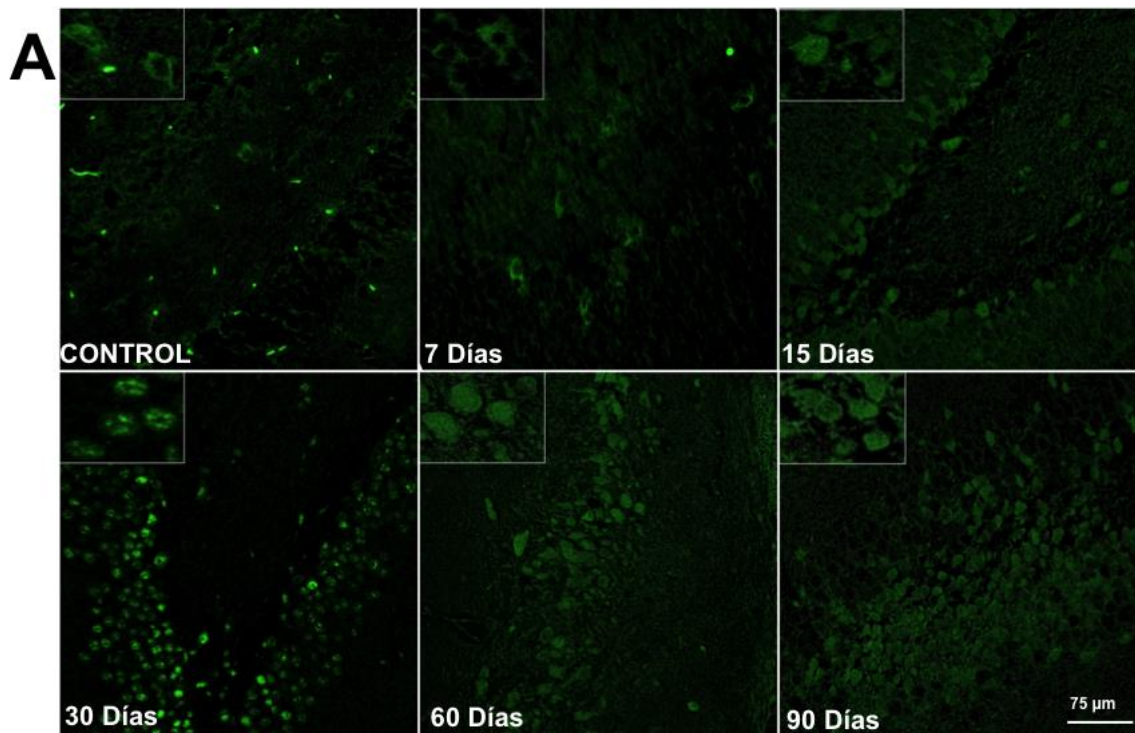


Figura 6.2. Efecto de la exposición a ozono sobre la expresión de pFoxO 1a en el hipocampo de ratas. (A) Las microfotografías muestran las células positivas a pFoxO 1a (verde) en la región del giro dentado en el hipocampo de ratas

expuestas a aire libre de ozono (control) y después de 7, 15, 30, 60 y 90 días de exposición a ozono. Se puede apreciar un incremento progresivo en la inmunorreactividad contra pFoxO 1a desde los 15 días y hasta los 60 días de exposición. Los recuadros muestran un aumento de áreas seleccionadas de las fotografías para observar con mayor detalle. (B) Western blot representativo que muestra el contenido de FoxO 1a total y pFoxO 1a en el hipocampo de ratas control y ratas expuestas a diferentes tiempos a ozono. El contenido de FoxO 1a total no mostró cambios a lo largo del tiempo. El análisis densitométrico de los Western blot se realizó en seis experimentos independientes. La gráfica representa los valores de las densitometrías presentados como el promedio \pm EEM (* $P < 0.05$).

6.3 Activación de FoxO3a

Se evaluó la activación de FoxO 3a por inmunohistoquímica mediante la determinación de su forma fosforilada (pFoxO 3a), observándose un incremento gradual en la inmunolocalización de esta proteína, en la porción del giro dentado del hipocampo de las ratas. Dicho incremento es evidente desde los 15 días y hasta los 60 días de exposición a ozono. En las micrografías (Figura 6.3A) se aprecia que esta proteína se localiza principalmente en el núcleo de las células. Por otra parte, el análisis mediante Western blot (Figura 6.3B) mostró un incremento significativo de la proteína pFoxO 3a a partir de los 30 días y hasta los 60 días de exposición a ozono, con respecto al control. A los 7, 15 y 90 días de exposición también se observa un incremento con respecto al control que no fue significativo.

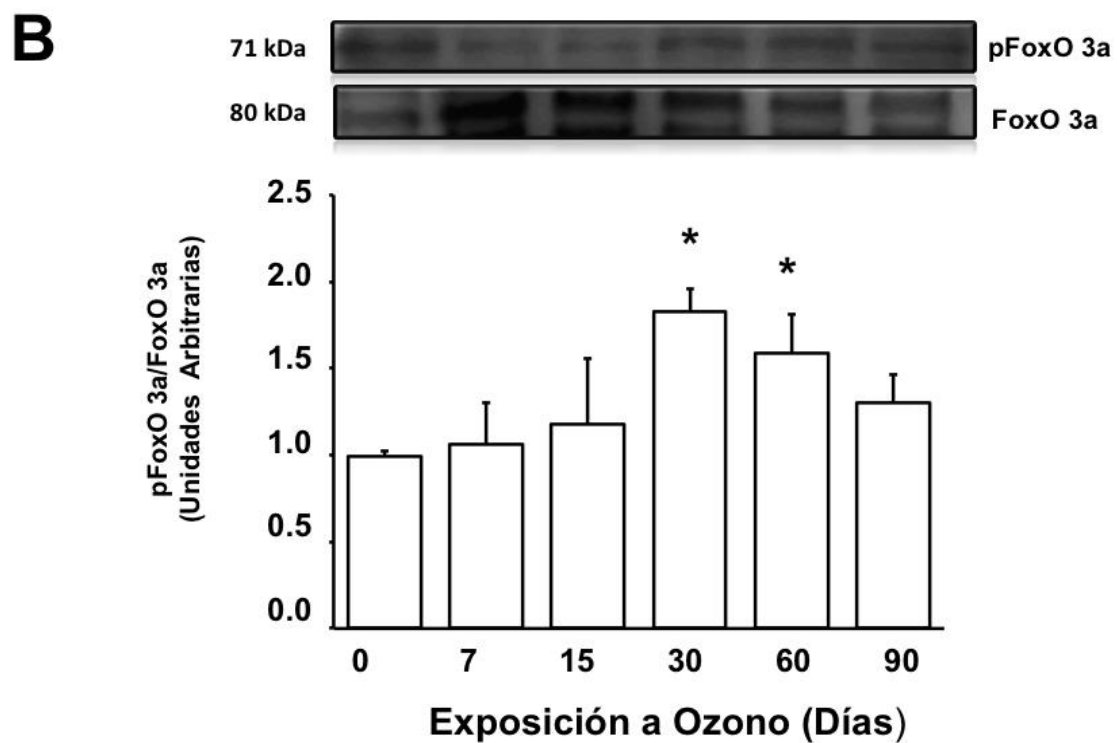
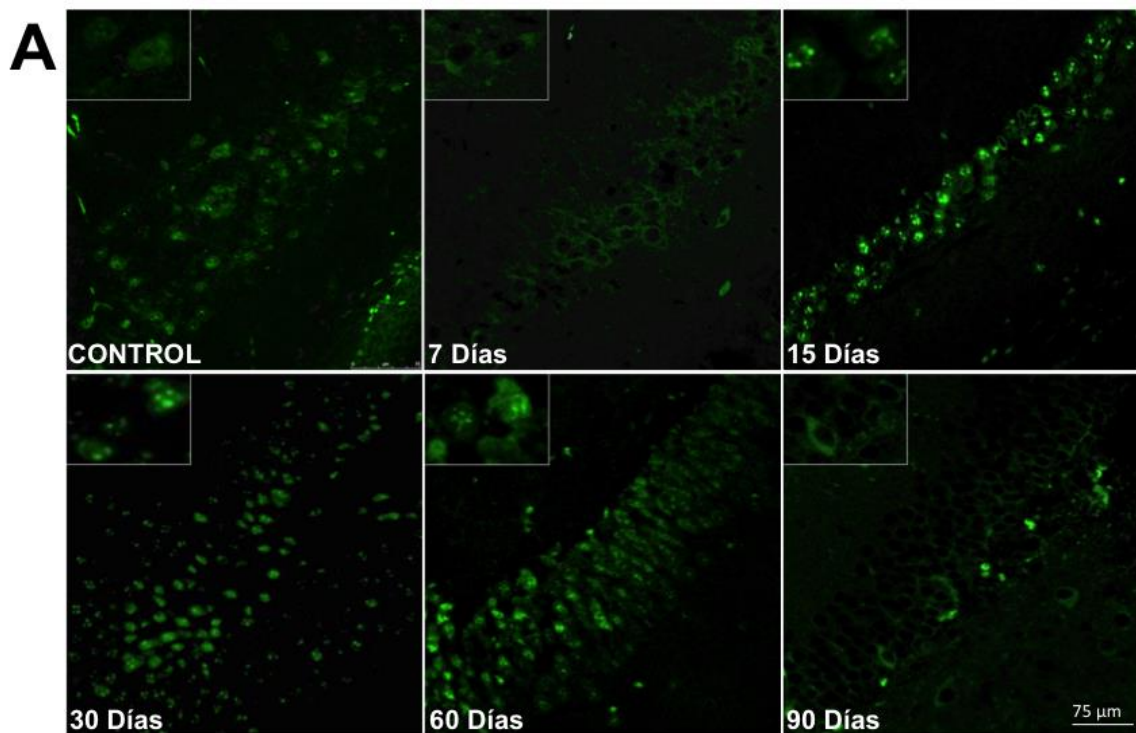


Figura 6.3. Efecto de la exposición a ozono sobre pFoxO 3a en el hipocampo de ratas. (A) Las microfotografías muestran células positivas (verde) a la forma

fosforilada de FoxO 3a (pFoxO 3a) en la región del hipocampo en ratas expuestas a aire libre de ozono (control) y después de 7, 15, 30, 60 y 90 días de exposición a ozono. Se observa un incremento progresivo en la inmunorreactividad contra pFoxO3a desde los 15 días y hasta los 60 días de exposición a ozono, a los 90 días de tratamiento se muestra que su localización se desplaza hacia el citoplasma. (B) Western blot representativo que muestra el contenido de FoxO 3a total y pFoxO 3a en el hipocampo de ratas expuestas a ozono durante diferentes tiempos. El análisis densitométrico de los Western blot se realizó en seis experimentos independientes. La gráfica representa los valores de las densitometrías, presentados como el promedio \pm EEM (* $P < 0.05$).

6.4 Determinación de ciclina D2

Durante todos los tratamientos de exposición a ozono se observó un incremento en el número de células inmunorreactivas para ciclina D2 (Figura 6.4A); a partir de los 30 días de tratamiento se pudo apreciar un aumento en la inmunorreactividad en los núcleos, sugiriendo la translocación de esta proteína hacia el núcleo en las células del giro dentado de las ratas tratadas. Los resultados del Western blot (Figura 6.4B) mostraron un aumento estadísticamente significativo a los 7, 30, 60 y 90 días de exposición a ozono.

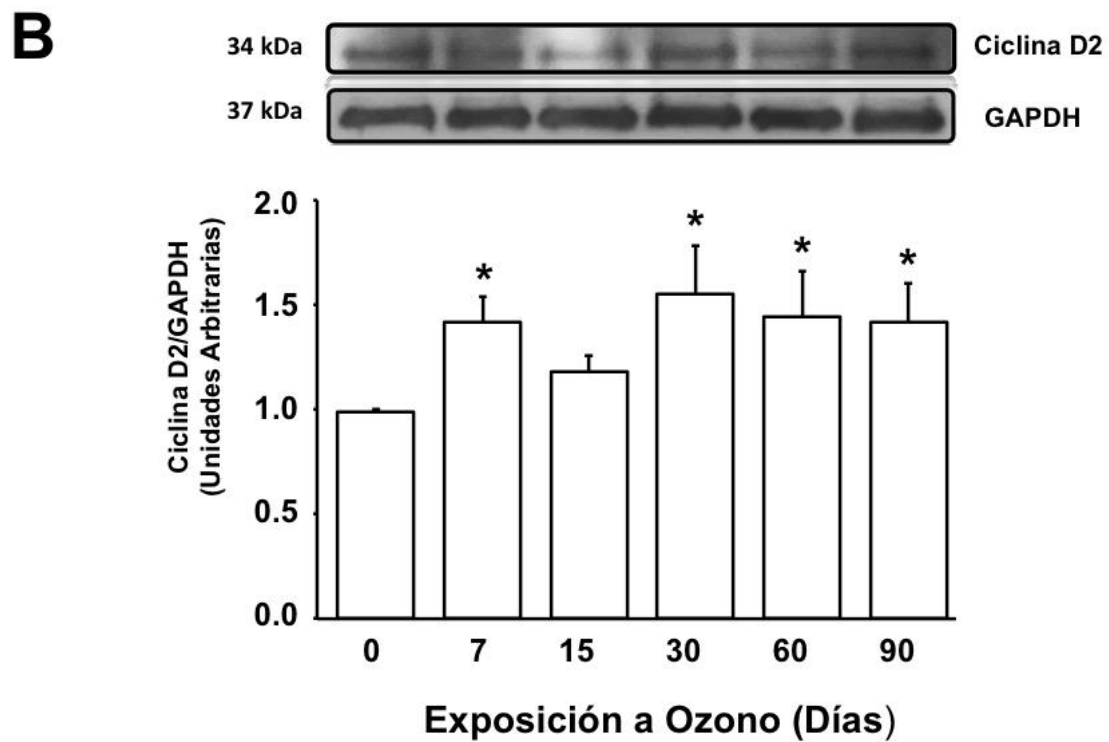
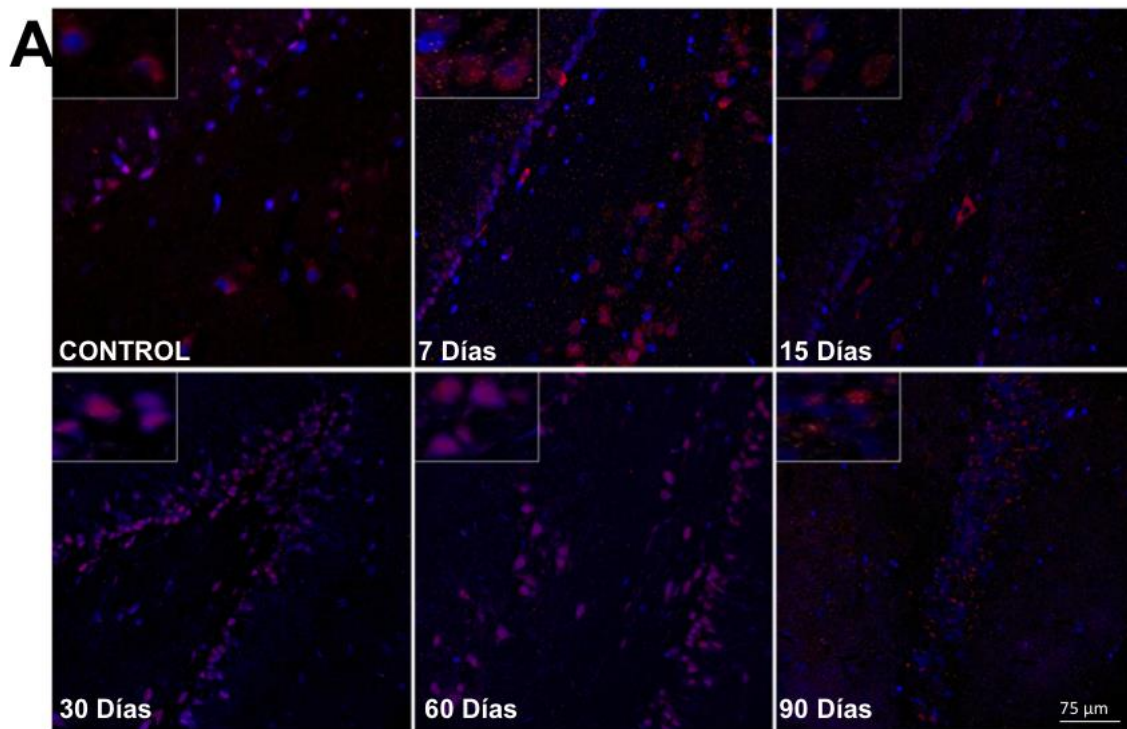


Figura 6.4. Efecto de la exposición a ozono sobre la inmunoreactividad de ciclina D2. (A) Las microfotografías muestran células positivas para ciclina D2 (rojo) en la región del giro dentado de ratas expuestas a aire libre de ozono

(control) y diferentes tiempos de exposición a ozono 7, 15, 30, 60 y 90 días. Se observó un incremento a los 7, 30, 60 y 90 días de exposición a ozono. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), se muestra claramente la co-localización nuclear de CD2 (rosa). (B) Western blot representativo que muestra incremento en el contenido de ciclina D2 durante todos los tratamientos, se empleó GAPDH como control de carga. Los Western blot se realizaron en seis repeticiones con muestras independientes. La gráfica representa los valores de las densitometrías, presentados como el promedio \pm EEM (* $P < 0.05$).

6.5 Determinación de doblecortina (Dcx)

El nivel de Dcx se determinó mediante Western blot (Figura 6.5). Esta proteína mostró un incremento significativo a los 30 y 60 días de exposición a ozono.

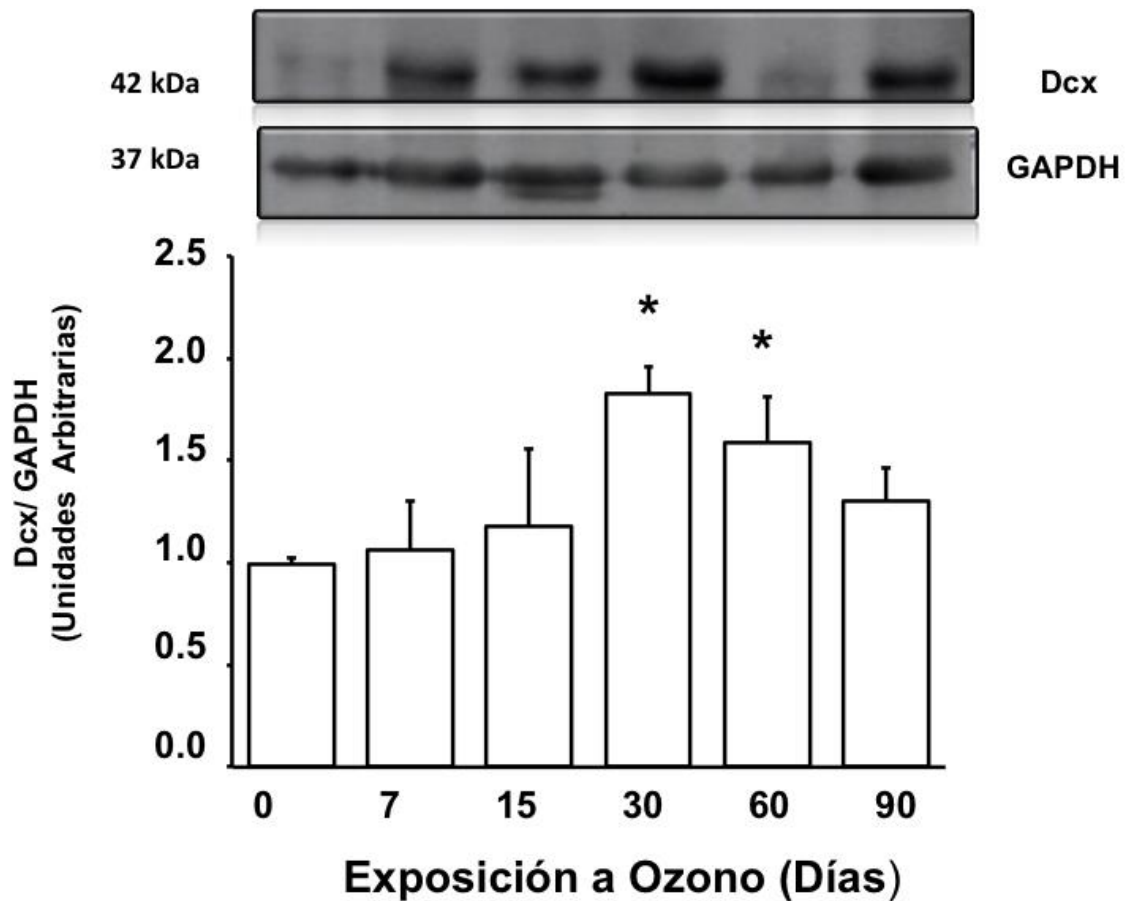


Figura 6.5. Efecto de la exposición a ozono sobre la expresión de Dcx en el hipocampo de ratas tratadas a bajas dosis. Western blot representativo y análisis densitométrico de seis experimentos independientes que revelan un incremento desde los 7 días y hasta los 30 días de tratamiento, mientras que a los 60 días se observa una disminución en la expresión de Dcx.

6.6 Determinación de caspasa 3 activa

Los niveles de caspasa 3 activas mostraron un incremento significativo en la con respecto a la expresión de caspasa 3 total (pro-caspasa) a los 30 días y 60 días de exposición a ozono comparados con el control (Figura 6.6).

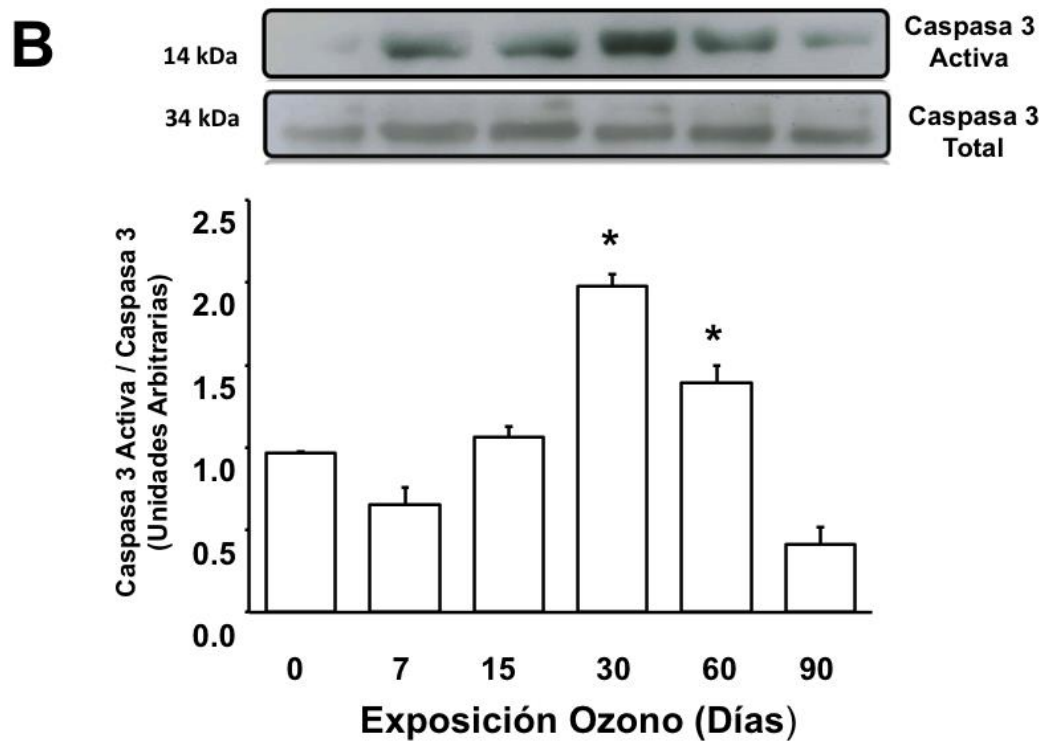
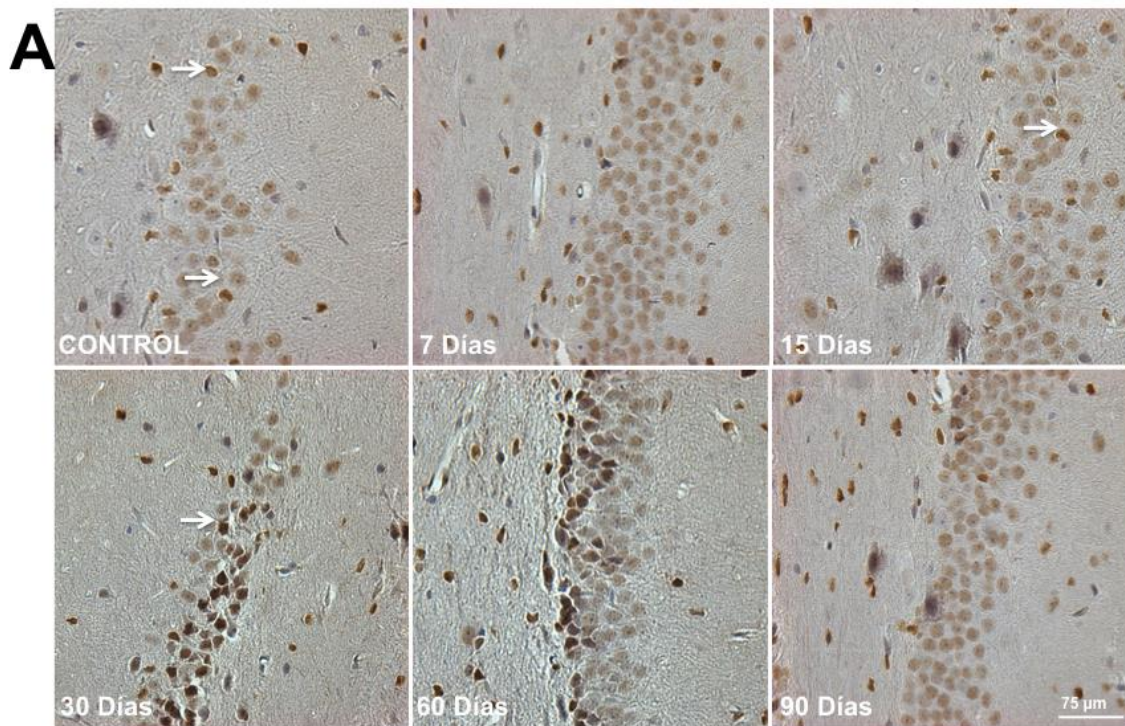


Figura 6.6. Efecto de la exposición a ozono sobre la activación de la caspasa 3 en el hipocampo de ratas. (A) Las microfotografías muestran células positivas para la caspasa 3 activa (marrón) en la región del giro dentado (flechas blancas). Se observó un incremento a los 30 y 60 días de tratamiento, mientras que a los 90 días se observa una disminución. Los núcleos fueron contra

teñidos con Hematoxilina (azul). (B) Western blot representativo y análisis densitométrico de seis experimentos independientes donde se muestra que existe un aumento en el nivel de caspasa 3 activa a los 30 y 60 días de tratamiento y una disminución a los 90 días de exposición a ozono. El gráfico muestra los datos como la media \pm EEM (* P < 0.05).

6.7 Determinación de SOD Mn

La expresión de la SOD Mn se determinó mediante western blot (**Figura 7**). Los resultados obtenidos mostraron un incremento gradual en la expresión de esta enzima desde los 7 días y hasta los 60 días de exposición a ozono.

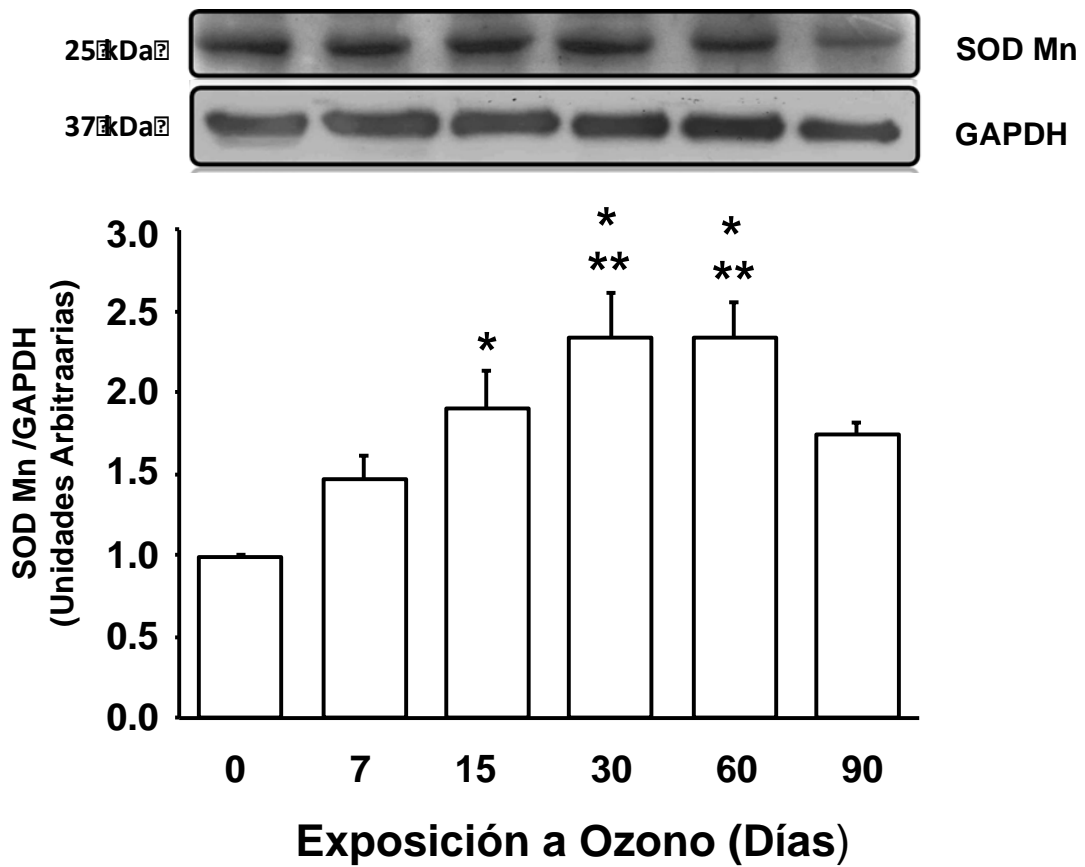


Figura 6.7. Efecto de los tratamientos con ozono sobre la expresión de SOD Mn en hipocampos de ratas. Western blot representativo y análisis densitométrico de seis experimentos independientes que revelan un incremento en la expresión de SOD Mn desde los 7 y hasta los 60 días de exposición a ozono. La gráfica muestra el promedio \pm EEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)

6.8 Determinación de FoxP3

Los niveles de FoxP3 se determinó mediante Western blot (Figura 6.8). Esta proteína mostró un incremento significativo a los 30 y 90 días de exposición a ozono.

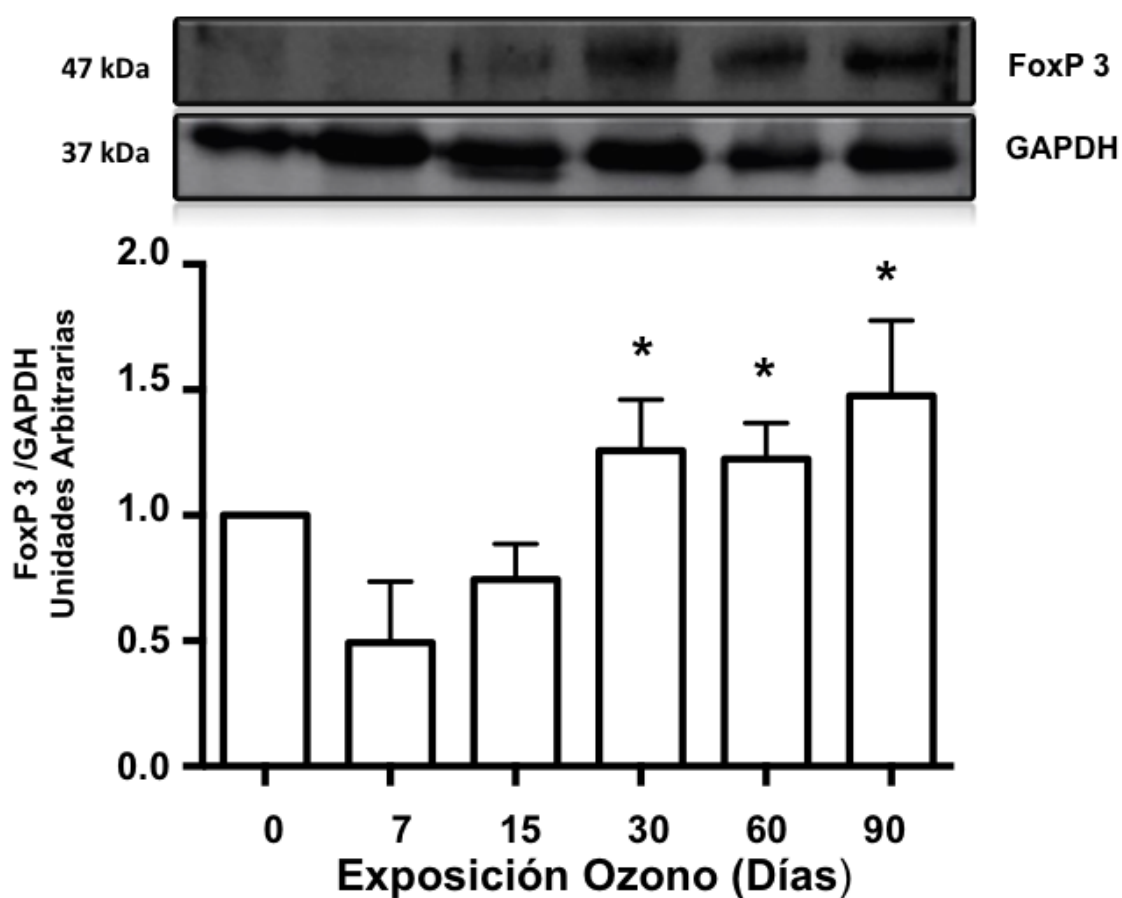


Figura 6.8. Efecto de la exposición a ozono sobre FoxP 3 en el hipocampo de ratas. Western blot representativo muestra un incremento gradual en la expresión de FoxP 3 en los hipocampos de la ratas expuestas a ozono durante diferentes tiempos. El análisis densitométrico se realizó en seis experimentos

independientes. La gráfica representa los valores de las densitometrías, presentados en promedios \pm SED (* P<0.05).

6.9 Determinación de IL-1 β

En la figura 6.9 se muestra la expresión de IL-1 β mediante western blot la cual mostró un incremento gradual con respecto a cada tiempo de exposición a ozono.

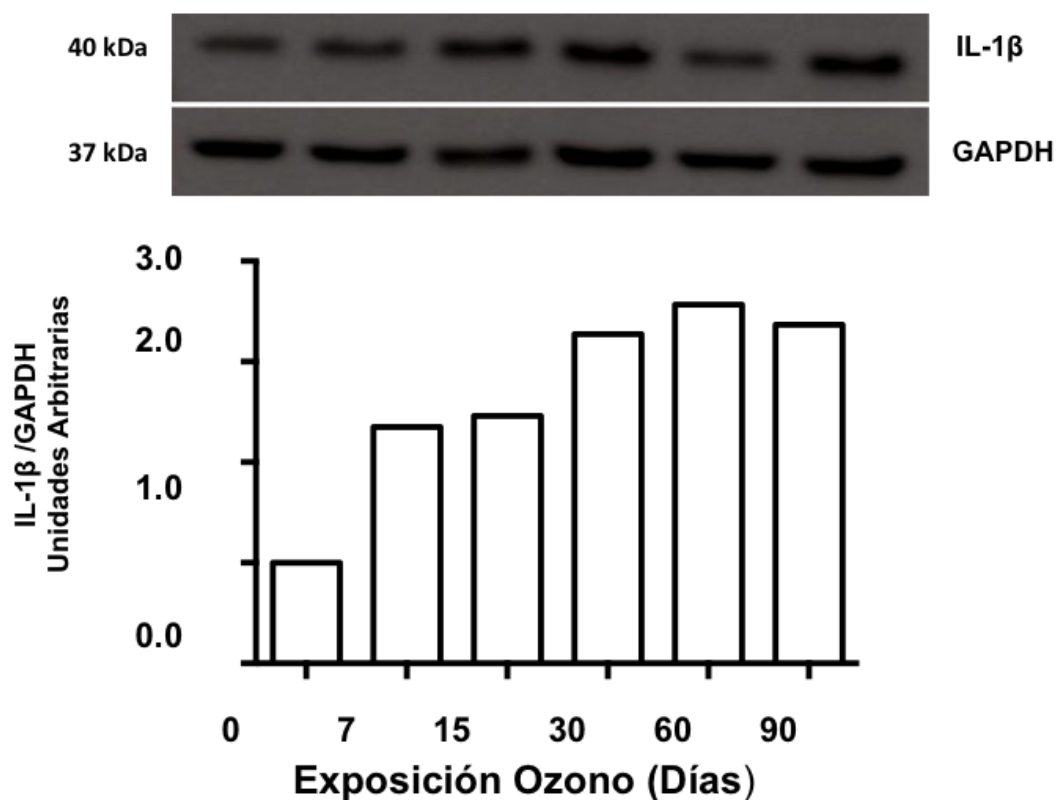


Figura 6.9. Determinación de la expresión de IL-1 β mediante Western Blot.

6.10 Determinación de IL-10

La expresión de IL-10 se determinó mediante Western blot. Esta proteína mostró un incremento a los 30 días de tratamiento, mientras que a los 60 y 90 días de exposición a ozono se observó un decremento de la misma (Figura 6.10).

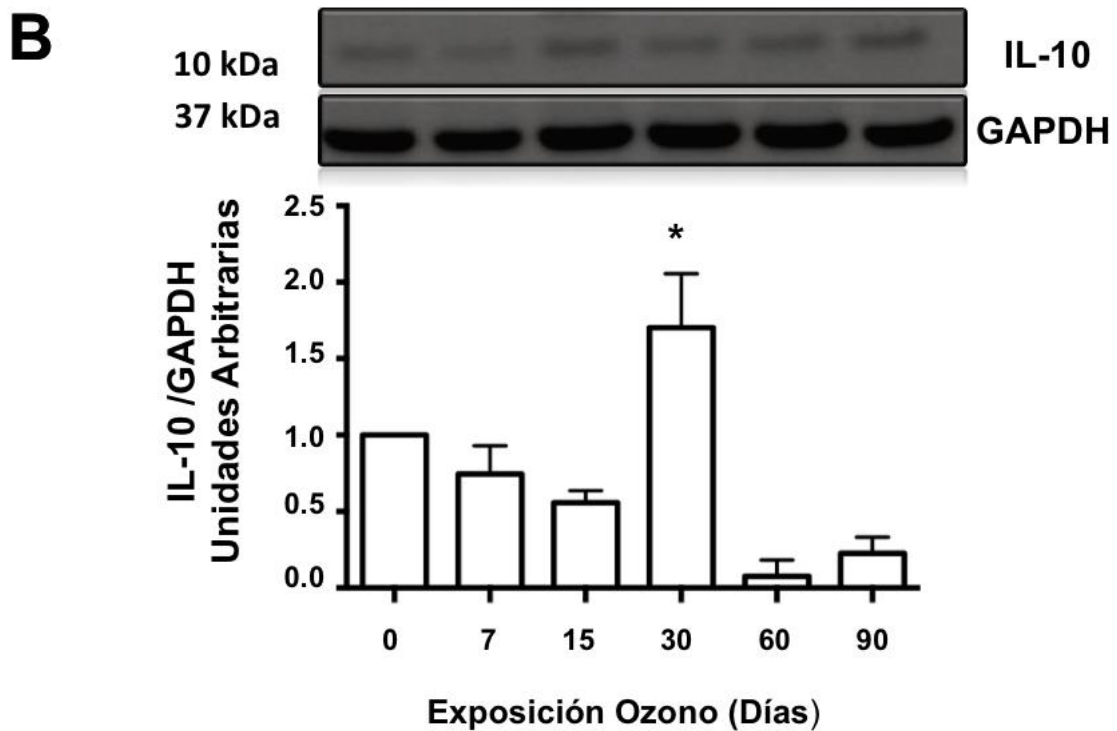
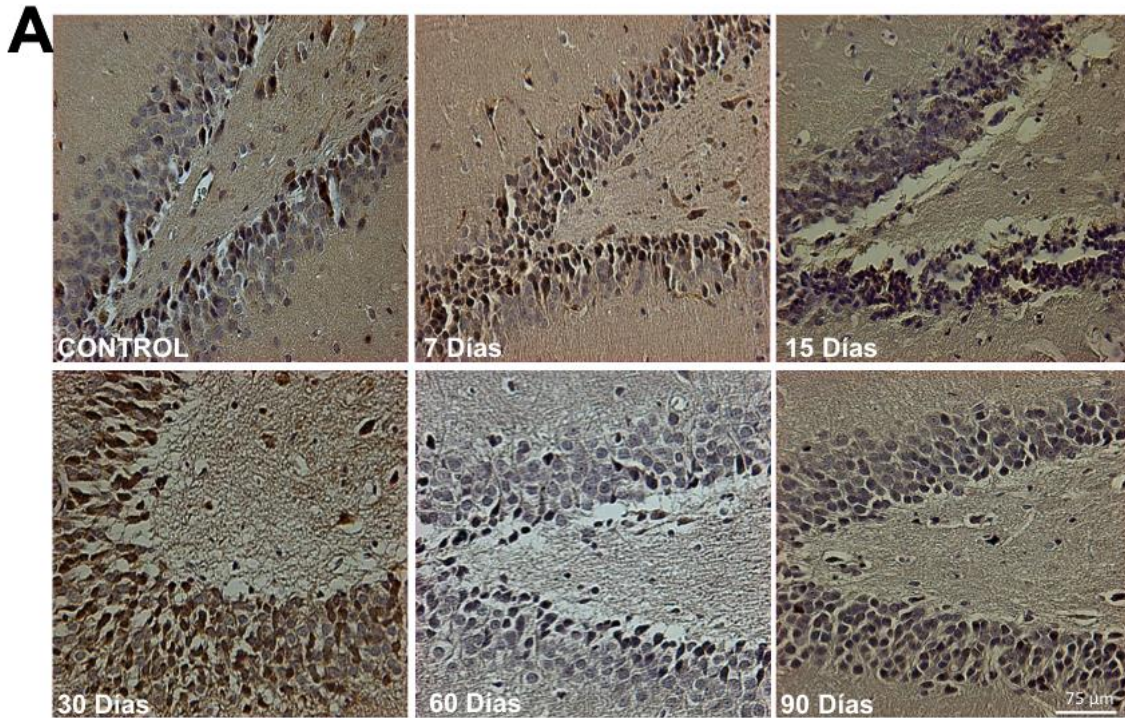


Figura 6.10. Expresión de IL-10 por efecto de la exposición crónica a bajas dosis de ozono. (A) Las microfotografías muestran células positivas para IL-10 (marrón) en la región del giro dentado. Se observó un incremento a los 30 días y una disminución a los 60 y 90 días de exposición a ozono. Los núcleos fueron contra teñidos con Hematoxilina (azul). (B) Western blot representativo muestra que incremento en el nivel de IL-10 a los 30 días de tratamiento, se utilizó GAPDH como control de carga. Western blot se realizaron en seis repeticiones con muestras independientes. La gráfica representa los valores de las densitometrías, presentados como el promedio \pm EEM (* $P < 0.05$).

6.11 Determinación de IL-17

Los niveles de IL-17 se determinaron mediante Western blot (Figura 6.10). Esta proteína mostró un incremento significativo a los 30, 60 y 90 días de exposición a ozono.

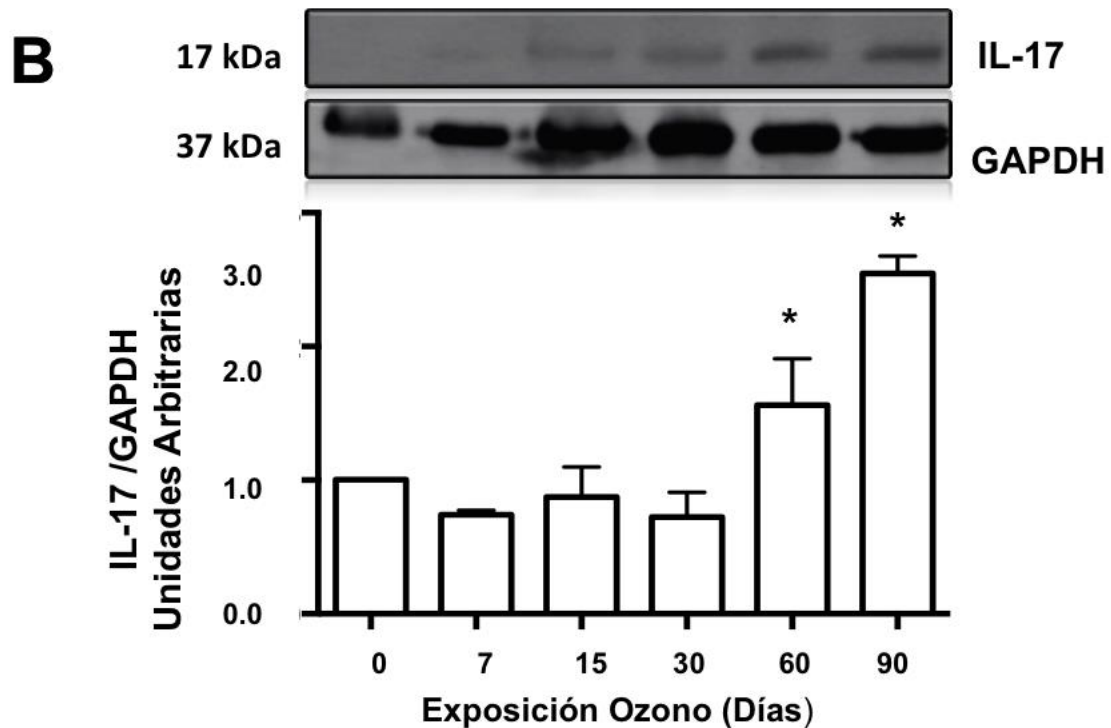
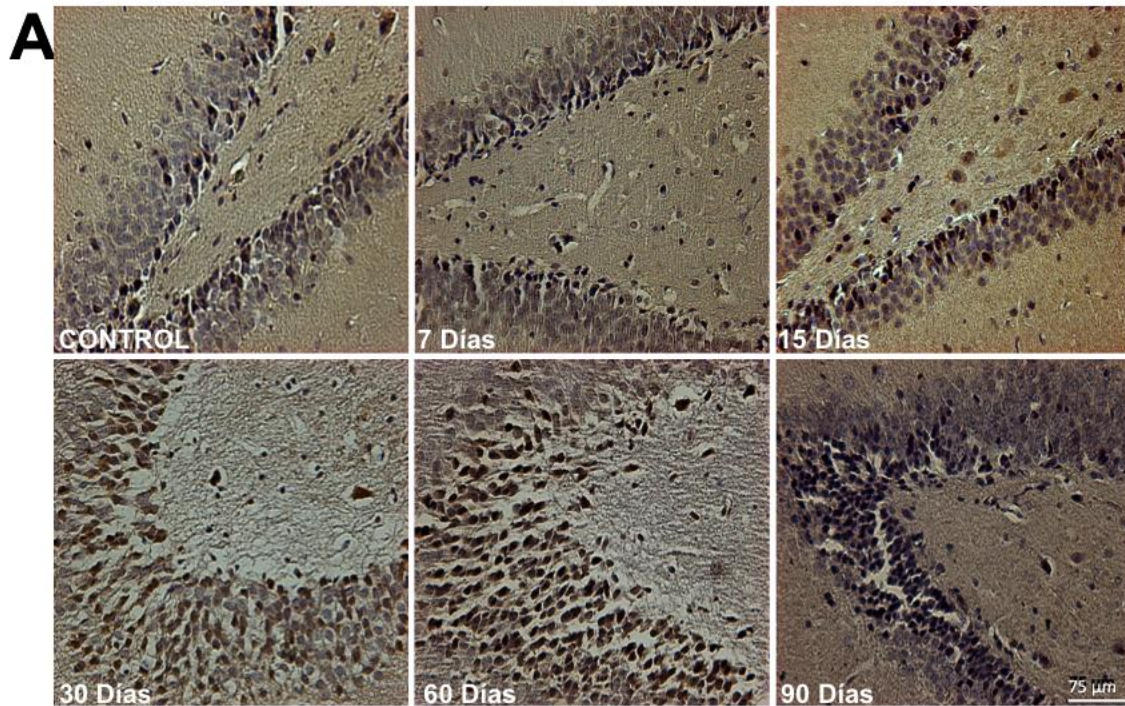


Figura 6.11. Efecto de la exposición crónica a bajas dosis de ozono sobre la expresión de IL-17 (A) Las microfotografías muestran células positivas para IL-17 (marrón) en la región del giro dentado. Se observó un incremento a los 60 y 90 días de exposición a ozono. Los núcleos fueron contra teñidos con Hematoxilina (azul). (B) Western blot representativo que muestra un incremento

a los 60 y 90 días de tratamiento. Los western blot se realizaron en seis repeticiones con muestras independientes. La gráfica representa los valores de las densitometrías, presentados como el promedio \pm EEM (* P<0.05).

7. DISCUSION

La contaminación ambiental es un factor de riesgo que contribuye al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (Paula Valencia Moulton, 2012). La exposición cada vez más intensa a los diferentes contaminantes ambientales es un serio problema de salud pública a nivel mundial, pues está relacionada con el 2.5% de todas las muertes en los países en vías de desarrollo (Narayan, Ali et al. 2010). El efecto de la exposición a los contaminantes ambientales sobre el sistema respiratorio y cardiovascular ha sido ampliamente estudiado, sin embargo su impacto en el sistema nervioso central (SNC) y particularmente su asociación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, es aún poco conocido (Sermin Genc, 2011).

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo murino de neurodegeneración por exposición a ozono, uno de los principales componentes de la contaminación ambiental. Se ha demostrado que la exposición crónica a bajas dosis de este gas genera un estado de estrés oxidativo que induce alteraciones en los procesos de memoria, aprendizaje y conducta motora de las ratas expuestas a este gas (Dorado-Martinez, Paredes-Carbajal et al. 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la exposición crónica a bajas dosis de ozono indujo un estado de estrés oxidativo en el hipocampo de las ratas expuestas; lo cual se demostró con un incremento en la cantidad de grupos carbonilo desde los 15 y hasta los 60 días de exposición a ozono

(Figura 6.1). Estos datos muestran indirectamente que la exposición a bajas dosis de ozono induce un aumento en la cantidad de ROS.

Además de su efecto pro-oxidante, las ROS son capaces de activar vías de señalización y promover la activación de factores de transcripción como los Forkhead Box O (FoxO) (Dansen 2011). La activación de los FoxO está regulada por factores de crecimiento de tipo insulínico (IGF) o por señales oxidativas. Los IGF's inducen la fosforilación de FoxO en su porción C- terminal a través de una cascada de señalización regulada por la proteína cinasa B (AKT/PKB), lo que resulta en su exclusión nuclear y la pérdida de su actividad transcripcional, por lo que la activación de esta vía presenta un efecto inhibitorio (van der Horst and Burgering 2007). Por otra parte, las ROS inducen la activación de estos factores de transcripción a través de la vía de JNK, promoviendo su translocación al núcleo y por tanto su actividad transcripcional (Brunet, Sweeney et al. 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un incremento en la forma fosforilada de los factores FoxO 1a y 3a (pFoxO 1a y pFoxO 3a) en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a ozono, lo cual sugiere que tanto FoxO 1a como FoxO 3a fueron activados por las ROS (Figuras 6.2 y 6.3). De igual manera, se observó un aumento en la expresión de FoxP 3, sugiriendo esto indica que las ROS también tienen un efecto sobre este factor de transcripción.

Cabe destacar que la inmunolocalización de pFoxO 1a mostró cambios en su distribución intracelular; mientras que a los 0 (control), 7 y 15 días de exposición a ozono se observó una localización citoplasmática, a los 30 y 60

días de exposición, se encontró localizado principalmente en la región nuclear y a los 90 días de tratamiento se observó nuevamente localizado en el citoplasma (Figura 6.2A). Estos resultados correlacionaron con los datos semicuantitativos obtenidos por Western blot, lo cual sugiere un aumento en la activación de FoxO 1a inducido por la exposición crónica a ozono. Para relacionar los cambios en la distribución celular de este factor de transcripción con su actividad transcripcional, se evaluó la expresión de la ciclina D2, proteína que participan en la regulación del ciclo celular. Existen reportes en condiciones de equilibrio redox, que indican que el aumento en la activación de FoxO 1a mantiene inhibida la expresión de ciclina D2. Los resultados realizados durante la pérdida del equilibrio redox mostraron un incremento en la expresión de la ciclina D2 durante todos los tiempos de exposición a bajas dosis de ozono a pesar del incremento en la activación de FoxO 1a (Figura 6.4), sugiriendo que este factor no realizó su efecto represor sobre la expresión de la ciclina D2 bajo estas condiciones (Schmidt, Fernandez de Mattos et al. 2002). En condiciones de equilibrio redox, las neuronas regulan el ciclo celular a través de la fosforilación de FoxO 1a (pFoxO1a) pues este factor de transcripción incrementa la expresión de la proteína p27 que a su vez, bloquea la síntesis de ciclina D2 e impide la progresión del ciclo celular. Esta actividad le confiere su función como supresor de tumores (Figura 8.1) (You and Mak 2005). Sin embargo, el aumento de la ciclina D2 puede deberse a una alteración en la vía de señalización de FoxO 1a o a la regulación por estrés oxidativo inducida por otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) y un miembro de la familia de protooncogenes, Myc (Blagosklonny and Pardee 2002; Morgan 2008). Estos resultados revisten

especial importancia debido a que en ciertas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, se genera un estado de estrés oxidativo y debe bloquearse la división celular; sin embargo, estos resultados sugieren que bajo condiciones de pérdida del equilibrio redox, este bloqueo del ciclo celular inducido por la activación de FoxO 1a se pierde.

Por otro lado, también se ha demostrado que durante el daño neuronal se incrementa la expresión y la activación de ciclina D2 en el tejido cerebral, tal y como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (Hernandez-Ortega and Arias 2012). Este aumento en los niveles de ciclina D2 induce la activación del ciclo celular y puede estar asociado con la formación de nuevas neuronas en regiones como el giro dentado del hipocampo o la zona subventricular. La generación de nuevas neuronas a partir de linajes precursores como los neuroblastos es un mecanismo que se conoce como neurogénesis, al cual se asocian procesos como la memoria, el aprendizaje y la plasticidad neuronal. En las primeras etapas de las enfermedades neurodegenerativas existe un aumento en la neurogénesis, sin embargo este proceso no es eficiente para compensar la pérdida neuronal durante el desarrollo de la enfermedad debido a la pérdida del equilibrio redox (Rivas 2010). Como se mencionó anteriormente en el modelo de exposición a ozono, se induce un proceso de neurodegeneración y esto nos permite sugerir que el aumento en la expresión de la ciclina D2 observado, podría estar asociado con la activación de la neurogénesis durante tiempos cortos de exposición a ozono (7, 15 y 30 días). Los resultados de este trabajo muestran un aumento en la expresión de la doblecortina (Dcx) (proteína característica de los neuroblastos) a los 30 y los 60

días de tratamiento (Figura 6.5), lo que coincide con el aumento en los niveles de ciclina D2 en el hipocampo de las ratas. Por otro lado, a los 90 días de exposición a ozono se observó una disminución en la expresión de Dcx, a pesar del aumento en la expresión de ciclina D2, lo cual puede estar asociado con la pérdida de la regulación del proceso de neurogénesis en presencia de estrés oxidativo crónico. También podría asociarse con la inducción de señales de muerte celular, ya que se ha descrito ampliamente que la activación del ciclo celular en células post-mitóticas como las neuronas, induce apoptosis. Para evaluar la activación de la vía apoptótica se determinó la expresión de la caspasa 3 en su forma activa (Figura 6.6), la cual mostró un aumento a los 30 y 60 días de exposición a ozono y esto correlaciona con lo observado para la Dcx y el aumento de la ciclina D2 en los mismos tiempos de exposición a ozono. Estos resultados sugieren un bloqueo del proceso de neurogénesis por activación de la vía apoptótica dependiente de caspasas (Friedlander 2003)

En relación con estos resultados nuestro grupo de trabajo ha demostrado en reportes previos, que la cantidad de neuroblastos aumenta desde los 7 y hasta los 30 días de exposición a ozono en el hipocampo de las ratas; sin embargo, desde los 30 y hasta los 90 días de exposición a este gas se observó un aumento en la muerte de los neuroblastos (Rivas-Arancibia, Guevara-Guzman et al. 2010). Esto sugiere que el incremento de ciclina D2 durante los tiempos cortos de exposición a ozono podría estar relacionado con la activación de mecanismos de reparación neuronal, mientras que su expresión y localización nuclear a partir de los 30 días de tratamiento podrían sugerir un bloqueo en el

proceso de neurogénesis y una re-entrada al ciclo celular en neuronas post-mitóticas, lo cual es característico del proceso de neurodegeneración.

Por otra parte, la determinación de pFoxO 3a por inmunohistoquímica también mostró cambios en su distribución celular. A los 0 y 7 días de tratamiento su localización se observó principalmente en el citoplasma, mientras que a los 15, 30 y 60 días se observó en el núcleo (Figura 6.3A). La determinación por Western blot mostró un incremento a los 15 y hasta los 90 días de exposición a ozono (Figura 6.3B). Este aumento en la expresión de pFoxO 3a puede estar inducido por el incremento en la producción de las ROS causado por la exposición crónica a ozono y a su vez podría activar vías que favorecen la resistencia al estrés oxidativo. Una de las funciones de FoxO3a está ligada a vías que regulan la transcripción de enzimas antioxidantes como la SOD Mn; por ello, se evaluó la expresión de dicha enzima. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de SOD Mn en todos los tiempos de exposición a ozono (Figura 6.7), lo que coincide con el aumento en la expresión de pFoxO 3a. Esto sugiere que la activación de FoxO 3a inducida por ROS podría estar contrarrestando el estado de estrés oxidativo a través del aumento en la expresión de SOD Mn. Sin embargo, en presencia de un estado de estrés oxidativo crónico, nuestro grupo de trabajo ha reportado que la actividad de esta enzima disminuye por la exposición crónica a ozono, lo cual no correlaciona con el incremento en su expresión aquí mostrado (Martínez-Rodríguez, 2013). Esta discrepancia podría ser resultado del daño oxidativo generado en su estructura como consecuencia del estado de estrés oxidativo inducido por la exposición crónica a ozono.

La participación de la respuesta inmune en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas ha sido ampliamente estudiado en los últimos años (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz 2012, Meraz-Rios, Toral-Rios et al. 2013). En individuos sanos donde existe un equilibrio redox, las células gliales se mantienen en un estado de reposo y los componentes inmunes de la circulación sistémica son excluidos del cerebro gracias a la función de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, la lesión neuronal o la presencia de agentes tóxicos, estimula la liberación de mediadores pro-inflamatorios que inducen una respuesta neuroinflamatoria, cuyo objetivo es eliminar el daño y restaurar la homeostasis en el cerebro. La respuesta neuroinflamatoria aguda es benéfica, ya que es autolimitada y se encarga de reparar los daños existentes, así como minimizar una lesión mayor; sin embargo, la liberación no regulada y prolongada de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , la IL-1 β ó el IFN- γ , crea un ambiente neurotóxico que promueve el daño en las neuronas y compromete la función cerebral. En general, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por presentar una respuesta neuroinflamatoria aguda inicial no reparadora que pierde su regulación y se encuentra seguida de una cascada de liberación de más citocinas que conduce a un estado de neuroinflamación crónica, lo que contribuye activamente a la progresión de la enfermedad.

La activación de los factores de transcripción de la familia Fox también participa en la respuesta inmune, ya que regula procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de células inmunes; además

modula la expresión de proteínas que participan en la señalización durante la respuesta inmune, tal es el caso de la interleucina 17 (IL-17) y su receptor (IL-17R). La expresión de estas proteínas está asociada específicamente con los niveles de expresión de FoxP3. Los resultados obtenidos muestran que las ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono incrementan la expresión de FoxP 3 (Figura 6.8), y el aumento en la expresión de este factor de transcripción está relacionado con un aumento en la expresión de IL-17 después de los 30 días de exposición a ozono. Este aumento en la expresión de IL-17 se relaciona con una disminución de la IL-10 desde los 60 días (Figura 6.10) y un aumento de IL-1 β durante todos los tiempos de exposición a ozono. Estos resultados sugieren una pérdida de la regulación de la respuesta inmune inducida por estrés oxidativo inducido en este modelo.

En resumen, la pérdida del balance redox por la exposición crónica a bajas dosis de ozono activa y aumenta la expresión de los FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3. La activación de FoxO3a se asocia con un aumento en la expresión de SOD Mn, aunque este aumento no está relacionado con un incremento en la actividad de esta enzima reportado previamente, bajo las mismas condiciones. Por otro lado, también aumenta la expresión y translocación de ciclina D2 al núcleo, activando la reentrada al ciclo celular de las neuronas, que a su vez podría estar induciendo la activación de señales de muerte en neuronas maduras, lo cual se refleja en un aumento en la expresión de caspasa 3-activa (Figura 6.6). Bajo condiciones de equilibrio redox, el incremento en la expresión de ciclina D2 podría ser bloqueado indirectamente por activación de FoxO1a;

sin embargo, el aumento del estado de estrés oxidativo podría estar modificando esta respuesta.

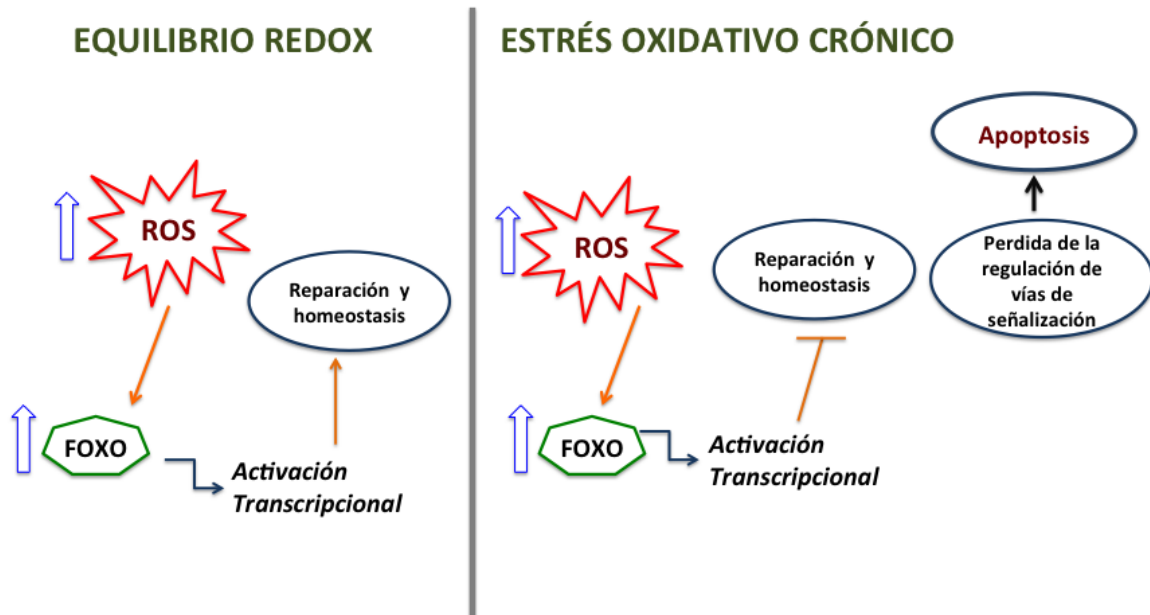


Figura 7.1. Regulación de FoxO bajo condiciones de equilibrio redox y en presencia de un estado de estrés oxidativo crónico.

8. CONCLUSIONES

Con estos datos podemos concluir que el estado de estrés oxidativo crónico generado por la exposición crónica a bajas dosis de ozono, es capaz de inducir un aumento en la producción de ROS, las cuales inducen un incremento en la activación de los factores de transcripción FoxO 1a, FoxO 3a y FoxP 3. Sin embargo, como resultado existe una pérdida en la regulación de las vías de señalización. Es posible que estos factores de transcripción puedan activar vías reguladoras que intentan contrarrestar el daño generado por el incremento en la producción de ROS y también regular la reentrada al ciclo celular así como activar señales que inducen apoptosis, lo que puede generar una pérdida de la regulación de la respuesta inmune. La falla en estos mecanismos de protección, aunada a los procesos de neurodegeneración generan un círculo vicioso en los mecanismos de daño celular (Figura 8.1).

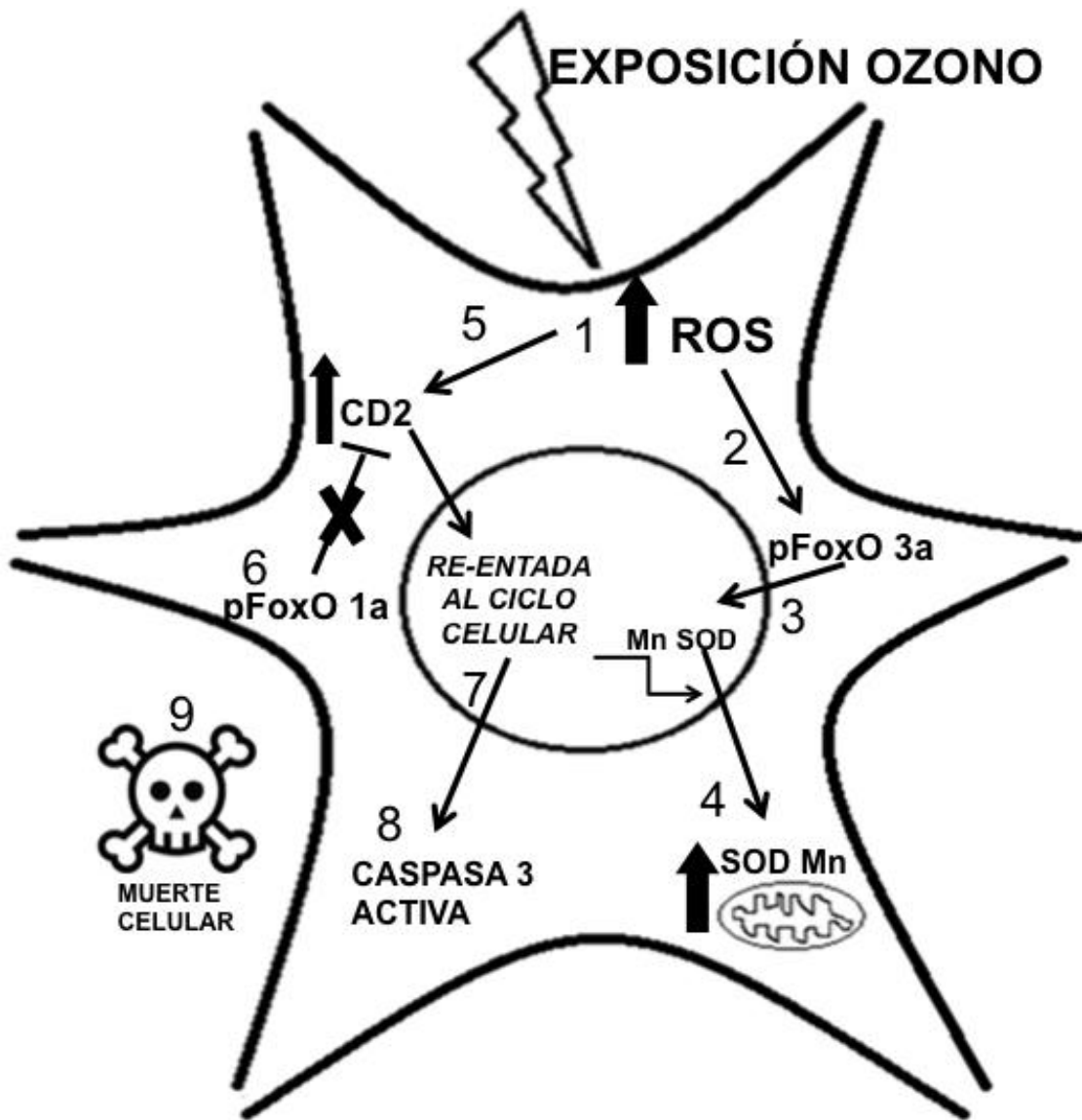


Figura 8.1. 1 La exposición crónica a bajas dosis de ozono causa un aumento en la cantidad de las ROS en las neuronas. 2 Lo que promueve la fosforilación del FoxO 3a y su translocación al núcleo. 3 Una vez activado el FoxO 3a este se transloca al núcleo y puede aumentar la transcripción de genes asociados a enzimas antioxidantes como la SOD Mn. 4 Esto puede inducir un aumento en la cantidad de esta enzima en la mitocondria y contrarrestar el daño generado por el incremento de las ROS. 5 Por otra parte, el incremento en las ROS también es capaz de inducir un aumento en la expresión de la ciclina D2. 6 En

condiciones de equilibrio redox FoxO 1a es capaz de bloquear la síntesis de ciclina D2; sin embargo, el estado de estrés oxidativo podría inhibir la actividad de FoxO 1a. 7 Así que el aumento de la ciclina D2 promueve la reentrada al ciclo celular. 8 Dado que las neuronas maduras no pueden dividirse, pueden activarse vías de muerte induciendo la activación de la caspasa 3. 9 Lo cual podría estar asociado a la presencia de una apoptosis catastrófica.

9. BIBLIOGRAFIA

Arts, I. C. and P. C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." *Am J Clin Nutr* **81**(1 Suppl): 317S-325S.

Aschenbrenner, K., L. M. D'Cruz, E. H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L. K. Swee, A. Rolink and L. Klein (2007). "Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells." *Nat Immunol* **8**(4): 351-358.

Blagosklonny, M. V. and A. B. Pardee (2002). "The restriction point of the cell cycle." *Cell Cycle* **1**(2): 103-110.

Boll, M. C., M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes and C. Rios (2008). "Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases." *Neurochem Res* **33**(9): 1717-1723.

Bondareff, W. (2013). "Age-related changes in brain extracellular space affect processing of amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **35**(1): 1-6.

Bromberg, P. A. and H. S. Koren (1995). "Ozone-induced human respiratory dysfunction and disease." *Toxicol Lett* **82-83**: 307-316.

Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H. L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. A. Sinclair, F. W. Alt and M. E. Greenberg (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." *Science* **303**(5666): 2011-2015.

Cao, J., S. Zhu, W. Zhou, J. Li, C. Liu, H. Xuan, J. Yan, L. Zheng, L. Zhou, J. Yu, G. Chen, Y. Huang, Z. Yu and L. Feng (2013). "PLZF mediates the

PTEN/AKT/FOXO3a signaling in suppression of prostate tumorigenesis." *PLoS One* **8**(12): e77922.

Ciocco, R. E., M. R. Carreno, J. M. Mathew, R. O. Garcia-Morales, L. Fuller, V. Esquenazi, G. Ciancio, G. W. Burke, J. J. Gaynor, B. B. Blomberg, A. Rosen, G. Kleiner, C. Ricordi and J. Miller (2007). "FoxP3 mRNA transcripts and regulatory cells in renal transplant recipients 10 years after donor marrow infusion." *Transplantation* **83**(12): 1611-1619.

Chabrier, P. E., C. Demerle-Pallardy and M. Auguet (1999). "Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases." *Cell Mol Life Sci* **55**(8-9): 1029-1035.

Dansen, T. B. (2011). "Forkhead Box O transcription factors: key players in redox signaling." *Antioxid Redox Signal* **14**(4): 559-561.

de Keizer, P. L., B. M. Burgering and T. B. Dansen (2011). "Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling." *Antioxid Redox Signal* **14**(6): 1093-1106.

Dorado-Martinez, C., C. Paredes-Carbajal, D. Mascher, G. Borgonio-Perez and S. Rivas-Arancibia (2001). "Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats." *Int J Neurosci* **108**(3-4): 149-161.

Friedlander, R. M. (2003). "Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases." *N Engl J Med* **348**(14): 1365-1375.

Gonzalez-Pina, R., C. Escalante-Membrillo, A. Alfaro-Rodriguez and A. Gonzalez-Maciel (2008). "Prenatal exposure to ozone disrupts cerebellar monoamine contents in newborn rats." *Neurochem Res* **33**(5): 912-918.

Henrotin, J. B., J. P. Besancenot, Y. Bejot and M. Giroud (2007). "Short-term effects of ozone air pollution on ischaemic stroke occurrence: a case-crossover

analysis from a 10-year population-based study in Dijon, France." *Occup Environ Med* **64**(7): 439-445.

Hernandez-Ortega, K. and C. Arias (2012). "ERK activation and expression of neuronal cell cycle markers in the hippocampus after entorhinal cortex lesion." *J Neurosci Res* **90**(11): 2116-2126.

Kaestner, K. H., W. Knochel and D. E. Martinez (2000). "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors." *Genes Dev* **14**(2): 142-146.

Manolopoulos, K. N., L. O. Klotz, P. Korsten, S. R. Bornstein and A. Barthel (2010). "Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress." *Mol Psychiatry* **15**(11): 1046-1052.

Martinez-Canabal, A., M. Angoa-Perez, C. Rugerio-Vargas, G. Borgonio-Perez and S. Rivas-Arancibia (2008). "Effect of growth hormone on Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of rats chronically exposed to ozone." *Int J Neurosci* **118**(3): 455-469.

Meraz-Rios, M. A., D. Toral-Rios, D. Franco-Bocanegra, J. Villeda-Hernandez and V. Campos-Pena (2013). "Inflammatory process in Alzheimer's Disease." *Front Integr Neurosci* **7**: 59.

Mills, N. L., K. Donaldson, P. W. Hadoke, N. A. Boon, W. MacNee, F. R. Cassee, T. Sandstrom, A. Blomberg and D. E. Newby (2009). "Adverse cardiovascular effects of air pollution." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **6**(1): 36-44.

Morgan, D. O. (2008). "SnapShot: Cell-cycle regulators II." *Cell* **135**(5): 974-974 e971.

Narayan, K. M., M. K. Ali and J. P. Koplan (2010). "Global noncommunicable diseases--where worlds meet." *N Engl J Med* **363**(13): 1196-1198.

Peng, S. L. (2008). "Foxo in the immune system." *Oncogene* **27**(16): 2337-2344.

Putker, M., T. Madl, H. R. Vos, H. de Ruiter, M. Visscher, M. C. van den Berg, M. Kaplan, H. C. Korswagen, R. Boelens, M. Vermeulen, B. M. Burgering and T. B. Dansen (2013). "Redox-dependent control of FOXO/DAF-16 by transportin-1." *Mol Cell* **49**(4): 730-742.

Rivas-Arancibia, S., R. Guevara-Guzman, Y. Lopez-Vidal, E. Rodriguez-Martinez, M. Zanardo-Gomes, M. Angoa-Perez and R. Raisman-Vozari (2010). "Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats." *Toxicol Sci* **113**(1): 187-197.

Rivas-Manzano, P. and C. Paz (1999). "Cerebellar morphological alterations in rats induced by prenatal ozone exposure." *Neurosci Lett* **276**(1): 37-40.

Rubio-Perez, J. M. and J. M. Morillas-Ruiz (2012). "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines." *ScientificWorldJournal* **2012**: 756357.

Rubio, V., M. Valverde and E. Rojas (2010). "Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway." *Environ Sci Pollut Res Int* **17**(2): 369-382.

Santiago-Lopez, D., J. A. Bautista-Martinez, C. I. Reyes-Hernandez, M. Aguilar-Martinez and S. Rivas-Arancibia (2010). "Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone." *Toxicol Lett* **197**(3): 193-200.

Santucci, D., A. Sorace, N. Francia, L. Aloe and E. Alleva (2006). "Prolonged prenatal exposure to low-level ozone affects aggressive behaviour as well as NGF and BDNF levels in the central nervous system of CD-1 mice." *Behav Brain Res* **166**(1): 124-130.

Schmidt, M., S. Fernandez de Mattos, A. van der Horst, R. Klompaker, G. J. Kops, E. W. Lam, B. M. Burgering and R. H. Medema (2002). "Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D." *Mol Cell Biol* **22**(22): 7842-7852.

Singh, R., B. Kaur, I. Kalina, T. A. Popov, T. Georgieva, S. Garte, B. Binkova, R. J. Sram, E. Taioli and P. B. Farmer (2007). "Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans." *Mutat Res* **620**(1-2): 71-82.

Skovronsky, D. M., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2006). "Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications." *Annu Rev Pathol* **1**: 151-170.

Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering and R. H. Medema (2002). "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2." *J Immunol* **168**(10): 5024-5031.

Uttara, B., A. V. Singh, P. Zamboni and R. T. Mahajan (2009). "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." *Curr Neuropharmacol* **7**(1): 65-74.

Valacchi, G., S. U. Weber, C. Luu, C. E. Cross and L. Packer (2000). "Ozone potentiates vitamin E depletion by ultraviolet radiation in the murine stratum corneum." *FEBS Lett* **466**(1): 165-168.

Valavanidis, A., K. Fiotakis and T. Vlachogianni (2008). "Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms." *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **26**(4): 339-362.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.

van der Horst, A. and B. M. Burgering (2007). "Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 440-450.

Webb, A. E., E. A. Pollina, T. Vierbuchen, N. Urban, D. Ucar, D. S. Leeman, B. Martynoga, M. Sewak, T. A. Rando, F. Guillemot, M. Wernig and A. Brunet (2013). "FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis." *Cell Rep* **4**(3): 477-491.

Wood-Kaczmar, A., S. Gandhi and N. W. Wood (2006). "Understanding the molecular causes of Parkinson's disease." *Trends Mol Med* **12**(11): 521-528.

Xia, M. and Y. Zhu (2013). "FOXO3a involvement in the release of TNF-alpha stimulated by ATP in spinal cord astrocytes." *J Mol Neurosci* **51**(3): 792-804.

You, H. and T. W. Mak (2005). "Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors." *Cell Cycle* **4**(1): 37-38.

Zhao, J. N., Q. Y. Lu, X. Q. Niu, P. Zhang, Z. Wang, J. Z. Lin, Y. H. Zhuang and J. Y. Lu (2013). "[Expression of FoxO3a in patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance]." *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **21**(4): 847-850.

Zhu, X., H. G. Lee, G. Perry and M. A. Smith (2007). "Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update." *Biochim Biophys Acta* **1772**(4): 494-502.