



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

CARACTERIZACION DEL PERFIL ANTIOXIDANTE DE LOS RATONES KNOCK-OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II Y SU IMPACTO EN EL ESTUDIO DE RUTAS ALTERNATIVAS DE FORMACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PERLA EUGENIA UGALDE MUÑIZ

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. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

CARACTERIZACION DEL PERFIL ANTIOXIDANTE DE LOS RATONES KNOCK-OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II Y SU IMPACTO EN EL ESTUDIO DE RUTAS ALTERNATIVAS DE FORMACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PERLA EUGENIA UGALDE MUÑIZ

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. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE DE 2014

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 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **UGALDE MUÑIZ PERLA EUGENIA** con número de cuenta **305151340**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ANTIOXIDANTE DE LOS RATONES KNOCK-OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II Y SU IMPACTO EN EL ESTUDIO DE RUTAS ALTERNATIVAS DE FORMACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de octubre de 2014

M. del Coro Arizmendi

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 **288719**). Así como sustentar la realización de este trabajo con los recursos otorgados al proyecto de investigación básica con el número de registro **183867**.

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.
- A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por brindarme siempre su apoyo en la realización de este proyecto, asimismo por sus valiosas contribuciones para su conclusión.

Agradecimientos a título personal

A la Dra. Verónica Pérez de la Cruz por dirigir este proyecto y transmitirme todos sus conocimientos para mi desarrollo durante la Maestría, además de brindarme su apoyo incondicional en todo momento gracias Vero por brindarme ante todo tu amistad y llevarme siempre de la mano por el camino de la excelencia académica. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, fue un privilegio ser tu alumna estos años.

Al Dr. José Pedraza Chaverrí por su gran contribución para realizar este trabajo al asesorarme y resolver las dudas que surgieron en este trayecto.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt por brindarme siempre su apoyo y además por siempre exigirme más y conducirme siempre por el camino de la excelencia académica mostrándome que siempre, uno puede ser mejor que el día anterior y que con esfuerzo y perseverancia todo se puede lograr muchas gracias por sus apreciables aportaciones a este escrito.

A la Dra. Selva Rivas que fue mi maestra y me enseñó muchas cosas, no solo en el aspecto académico si no en lo personal, ya que los conocimientos adquiridos fueron pieza clave para la exitosa culminación de este proyecto, para mí fue un privilegio ser su alumna.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por brindarme siempre su apoyo y amistad y por ser uno de los mejores profesores que he tenido, del cual pude aprender muchas cosas y que me abrió las puertas hacia el mundo científico, hace algunos años atrás, gracias por ser de esos profesores que marcan tu vida y se vuelven un modelo a seguir.

Finalmente a la Dra. Araceli Díaz Ruíz que aunque no nos conocemos desde hace mucho tiempo, es una persona a quien admiro mucho ya que con su trayectoria académica es un claro ejemplo de que el arduo trabajo y el esfuerzo, al final tienen su recompensa muchas gracias por sus apreciables aportaciones a este escrito.

DEDICATORIAS

A mi madre que es la mujer que más admiro en el mundo, es mi compañera, mi mejor amiga, mi maestra y mi ejemplo a seguir y aunque nunca creo poder llegar tan alto como ella, espero algún día acercarme. Te amo mamá gracias por estar siempre conmigo.

A mi padre a quien amo muchísimo y siempre me ha brindado su apoyo incondicional y ha sido pieza clave para ser lo que soy hoy en día.

A mi hermana Jazmín que amo con todo mi corazón, porque siempre me enseña un lado nuevo de la vida y me enseña cosas nuevas todo el tiempo, además de siempre brindarme su apoyo y cariño.

A Rafael mi esposo que es el amor de mi vida y a quien admiro muchísimo, gracias por ser mi compañero de vida y siempre brindarme tu apoyo incondicional por ser mi compañero de aventuras, pero sobre todo por ser mi mejor amigo y estar a mi lado siempre. Te amo Pezcardilla

A mi pequeña Dolce y mi pequeño Juno porque son mis pequeños amores peludos y sin ellos mi vida no sería tan divertida.

Índice de contenidos

1. RESUMEN / ABSTRACT	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 LA VÍA DE LAS KINURENINAS.....	4
2.2 GENERALIDADES DEL ÁCIDO KINURÉNICO (KYNA).....	6
2.2.1 KYNA EN DESÓRDENES NEURODEGENERATIVOS.....	7
2.2.2 KYNA COMO ANTIOXIDANTE.....	8
2.3 LAS KAT'S Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DE KYNA A PARTIR DE LA L-KYN	9
2.4 LOS RATONES KNOCK OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II (KAT II KO) COMO MODELO DE ESTUDIO	11
2.5 RUTAS ALTERNAS DE FORMACIÓN DE KYNA.....	12
2.6 EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITROGENO	14
2.6.1 DAÑO OXIDATIVO A MACROMOLÉCULAS Y LOS PRINCIPALES MECANISMOS ANTIOXIDANTES	16
2.7 3-NITROPROPIONICO COMO MODELO DE DAÑO OXIDATIVO Y TOXICIDAD	19
3. HIPOTESIS.....	21
4. OBJETIVO GENERAL.....	21
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 ANIMALES Y REACTIVOS.....	22
5.1.1 CARACTERIZACIÓN DE RATONES KATII KO Y SILVESTRES	23
5.1.2 NIVELES DE KYNA, PERFIL ANTIOXIDANTE Y ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE L-KYNURENINA Y 3-NP	24
5.2 PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS.....	25
5.3 DETECCIÓN DE KYNA POR HPLC.....	25
5.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVCAS DEL OXÍGENO	26
5.5 DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....	26
5.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR LOWRY	27
5.7 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)	27

5.7.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA	28
5.7.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA	28
5.7.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA	29
6. RESULTADOS	29
6.1 CARACTERIZACIÓN DE RATONES KO KATII Y SILVESTRES	29
6.1.1 DETERMINACIÓN DE KYNA EN LOS RATONES <i>KO KATII</i> A DIFERENTES EDADES	30
6.1.2 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ANTIOXIDANTE DE LOS RATONES KO KATII	32
6.1.3 EFECTO DE LA ADMINITRACIÓN DE 3-NP Y L-KYN EN LA FORMACIÓN DE ERO Y EN LA PEROXIDACIÓN DE LIPIDOS	36
6.1.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE L-KYN Y 3NP EN LA FORMACIÓN DE KYNA	43
7. DISCUSION.....	47
8. CONCLUSIONES	50
9. BIBLIOGRAFÍA	52

1. RESUMEN / ABSTRACT

El ácido kinurénico (KYNA), es un antagonista de los receptores colinérgicos $\alpha 7$ nicotínicos y de los N-metil-D-Aspartato (NMDA), que ejerce un papel importante en funciones fisiológicas en el sistema nervioso y es sintetizado por transaminación irreversible de la L-kinurenina, un metabolito del triptófano. A su vez, esta reacción es catalizada mayormente por las kinureninas aminotransferasas (KATs) I y II. Aunque algunos estudios postulan la existencia de vías alternas de formación de KYNA que podría involucrar a la L-KYN (L-kinurenina) y a las especies reactivas del oxígeno. Debido a la importancia de KYNA en el Sistema Nervioso, el grupo del Dr. Schwarcz diseñó los ratones knockout para la principal enzima de síntesis de este metabolito la kinurenina aminotransferasa II (KAT II); sin embargo, a pesar de que a los primeros 21 días de edad estos ratones presentan niveles muy bajos de KYNA que correlacionan con anomalías en su neurotransmisión acompañadas de hiperactividad, a los dos meses de edad todas estas alteraciones se revierten y regresan a estados basales; incluso los niveles de KYNA se ven totalmente restituidos. Estos datos sugieren mecanismos alternativos de producción de KYNA que podrían no involucrar a ninguna isoforma de las KAT's. Por ello, el propósito de este trabajo es caracterizar el perfil antioxidante de los ratones *KO KATII* y observar si presentan alguna deficiencia antioxidante per se, así como observar si estos ratones son más susceptibles al daño tóxico evocado por el 3-NP y finalmente observar si la producción de KYNA en los ratones *KO KATII* se favorece bajo condiciones de estrés oxidante y la conjunta administración de la L-KYN. Para esto se evaluó la actividad de la SOD, GPx y GR así como los niveles de GSH, de ERO, de PL y de KYNA en ratones *KO KATII* y wild type de 28 días de edad, a la par se evaluó la formación de ERO, la PL, así como los niveles de KYNA en ratones administrados intraperitonealmente con L-KYN, 3-NP y un grupo con ambos tratamientos. Los resultados muestran que en los ratones *KO KATII* los niveles de KYNA van aumentando conforme aumenta la edad de los ratones, hasta alcanzar los niveles de KYNA normales, excepto en el hígado, sin embargo en el riñón la delección del gen para la KAT II no ocasionó una disminución de los niveles de KYNA, lo que sugiere que la formación de KYNA en el riñón es independiente de la KATII y que

probablemente involucre otras isoformas de esta enzima. Los ratones KO presentaron mayores niveles de basales de ERO y PL, además de alteraciones en la actividad de las tres enzimas antioxidantes que se evaluaron (SOD, GPx y GR) pero no se observó un patrón en particular, sin embargo en los ratones KO hay una mayor cantidad de glutatión reducido (GSH) lo cual podría deberse a una mayor actividad de la enzima γ -glutamyl-cisteína sintetasa y de la glutatión sintetasa en estos ratones. Por otro lado la administración de L-KYN aumento los niveles de KYNA en ambos genotipos de ratones, mostrando la formación de KYNA a partir de la L-KYN independientemente a la actividad de la KAT II. Mientras que la administración de L-KYN en conjunto con 3-NP indujo un aumento en la formación de KYNA solo en la corteza, hipocampo y estriado de los ratones WT lo que demuestra, la formación de KYNA, a partir de la interacción de la L-KYN y las especies reactivas del oxígeno, sin embargo no se observó este mismo efecto en los ratones *KO KATII* en ninguna de las regiones estudiadas. Además la administración de 3-NP indujo un aumento en la formación de ERO y la PL en ambos genotipos de ratones, siendo este aumento mayor en los ratones *KO KATII* y la administración en conjunto con la L-KYN fue capaz de disminuir el daño evocado por esta toxina.

Abstract

Kynurenic acid (KYNA) is an antagonist for cholinergic $\alpha 7$ nicotinic receptors and for N-methyl-D-aspartate (NMDA), and exerts an important role on several physiological functions in central nervous system (CNS). KYNA is synthesized by irreversible transamination of L-kynurenine (L-KYN), a metabolite produced by tryptophan metabolism. This reaction is catalyzed by kynurenine aminotransferases (KATs) I and II, although some studies propose the prevalence of different production pathways that may involve reactive oxygen species (ROS) and L-KYN. Due to its importance of KYNA in CNS, Dr. Schwarcz designed KO mice for KAT II, the isoform responsible for the major KYNA production; so KYNA levels are decreased in these mice, however, even though in the 21 PND the animals show low KYNA levels that correlates with neurotransmission alterations accompanied by hyperactivity, at two months these alterations are reverted and KYNA levels are totally reinstated. These results suggest the existence of alternative mechanisms for KYNA production that may not involve KATs activity. Therefore the aim of this work was to characterize the antioxidant profile of these KO mice for KAT II and determinate if exist any alterations in antioxidant systems *per se*, as well as evaluate if these mice show more susceptibility to toxicity evoked by 3-nitro propionic acid (3-NP) and determinate if KYNA production in KO KAT II mice is favored by co-administration with L-KYN. In order to prove this, the enzymatic activity of SOD, GPx and GR were evaluated, also GSH, ROS, lipid peroxidation (LP) and KYNA levels were determined in KO and WT mice (28 PND). On the other hand, ROS, LP and KYNA levels were also evaluated in mice treated intraperitoneal with L-KYN, 3-NP and conjugated. Our result show that KO KAT II mice develop increasing KYNA levels relative to age until these levels raise basal values (WT likewise), however, liver maintain lower levels, and kidney did not decrease KYNA at any age, this suggest that KYNA formation is independent of KAT II in kidney and probably other isoforms are responsible for this production. KO mice showed higher basal levels of ROS and LP, and alterations in enzymatic activity of SOD, GPx and GR. However KO mice showed higher GSH levels which could be due to increased activity of γ -glutamyl-cistein synthetase and glutathione synthetase. On the other hand L-KYN administration induced high levels of KYNA in both genotypes. 3-NP and L-KYN co-administrated induced an increase in KYNA levels, but only in cortex, hippocampus and corpus striatum in WT, this show that KYNA increases due to interaction between L-KYN and ROS (Generated by 3-NP), however this effect was not observed in KO mice. 3-NP induced an increase in ROS, LP in both genotypes, but this was higher in KO mice, and L-KYN attenuated the oxidative markers evoked by 3-NP.

2. ANTECEDENTES

2.1 LA VÍA DE LAS KINURENINAS

La vía de la kinurenina (VK) es la principal ruta catabólica del L-triptófano en mamíferos, y su principal función es la producción de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) (Beadle et al., 1947). Esta vía se lleva a cabo principalmente en hígado, riñón y cerebro de humanos, primates no humanos, roedores y otros mamíferos menores (Vender, 1975; Moroni et al., 1988). Es importante mencionar que los humanos y los animales no poseen una maquinaria enzimática que les permita sintetizar triptófano por ellos mismos, es por esto que el triptófano lo obtienen de la dieta en forma de proteínas.

El primer paso de la vía es romper oxidativamente la estructura de anillo del L-triptófano, esto es controlado por dos enzimas la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) que se localiza en el hígado (Hayashi et al., 1957) y la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) que se localiza en el cerebro (Hayaishi, 1976) dicha reacción es dependiente de superóxido, por tanto requiere de sistemas generadores de este radical como son el ascorbato y la xantina-xantina-oxidasa, siendo inhibida por la superóxido dismutasa (Hirata y Hayaishi, 1971) y por el óxido nítrico (Thomas et al., 1994). El producto de esta reacción es la N-formil kinurenina, el siguiente paso es la conversión de la N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN), que va a servir de sustrato para diferentes enzimas: la kinurenasa - que produce ácido antranílico (ANA), las kinureninas aminotransferasas (KAT's) que catalizan la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA) y la kinurenina 3-hidroxilasa que forma 3-hidroxikinurenina (3-HK), esta última enzima es la que presenta la mayor afinidad por la kinurenina, lo que sugiere que bajo condiciones normales, es la que metaboliza la mayor parte de la kinurenina disponible (Bender y McCreanor, 1982).

El ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA) puede formarse por dos vías, la primera mediante la kinureninasa, en donde una enzima piridoxal dependiente de fosfato y que se encuentra en el citosol convierte a la 3-hidroxikinurenina (3-HK) a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA), la otra vía es a partir del ácido antranílico el cual puede ser hidroxilado por enzimas de hidroxilación microsomal no específicas y producir de esta manera el 3-HA.

A través de la hidroxilación de la kinurenina a 3-hidroxikinurenina (3-HK) se forma otro metabolito de la vía, el ácido quinolínico (QUIN). Esta reacción es llevada a cabo por la kinurenina hidroxilasa (Okamoto et al., 1967) y requiere de la presencia de NADPH como donador de un electrón (Figura 1).

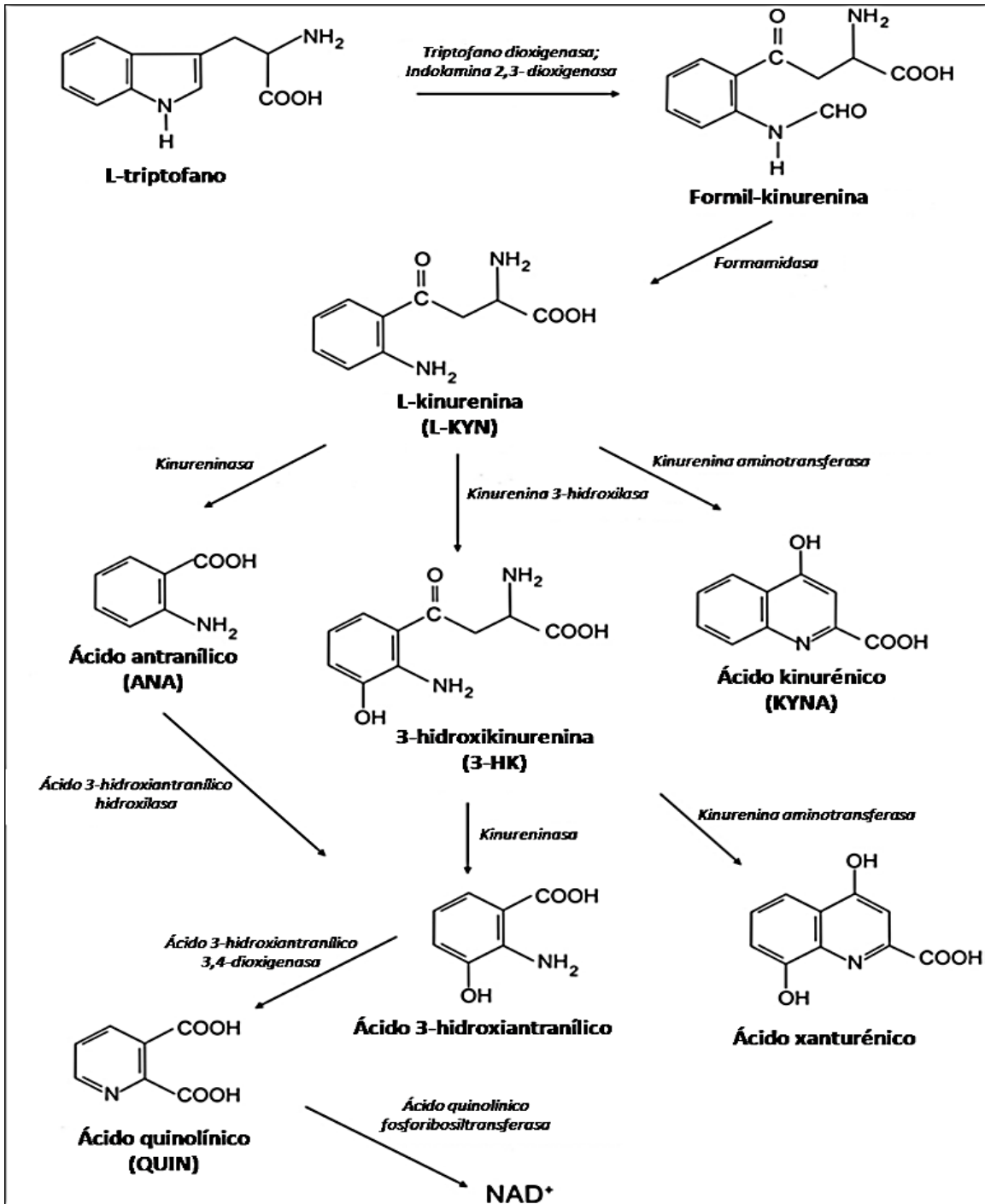


Figura 1. Vía de la kinurenina (Vía de la kinurenina, modificado de Vamos et al, 2009)

2.2 GENERALIDADES DEL ÁCIDO KINURÉNICO (KYNA)

El KYNA (Figura 2) fue identificado por primera vez en 1853 en orina canina (Liebig, 1853), pero fue sino hasta 1904 (Ellinger, 1904) que se reconoció como un producto de la degradación del triptófano por la VK (Vía de las kinureninas). Este metabolito ha sido ampliamente descrito como un antagonista competitivo del sitio para glicina en receptores NMDA (NMDAr) (Stone, 1993; Parsons *et al.*, 1997), y bloquea de manera no competitiva receptores $\alpha 7$ -nicotínicos (Hilmas, *et al.*, 2001) por lo que se le reconoce como un agente neuroprotector endógeno. Sin embargo, el efecto de KYNA sobre receptores para NMDA oscila en 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 para el receptor NMDA. Sin embargo, también se ha observado que el KYNA puede unirse a los receptores glutamatérgicos AMPA por diferentes mecanismos concentración-dependientes, comportándose como un modulador (excitador/inhibidor) en la señalización neuronal (Prescott *et al.*, 2006; Rozsa *et al.*, 2008).

2.2.1 KYNA EN DESÓRDENES NEURODEGENERATIVOS

Si bien el KYNA ejerce un papel muy importante a nivel fisiológico como regulador en la neurotransmisión, se puede inferir que algún desbalance en su concentración podría traer consigo modificaciones en estos 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 que alteraciones en la VK, particularmente los niveles de KYNA se asocian a diferentes neuropatologías.

Se ha observado que en líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer, los niveles de KYNA se ven significativamente disminuidos (Heyes *et al.*, 1992), no obstante, Baran y colaboradores (1999) al evaluar los niveles de KYNA en distintas regiones de cerebros *post mortem* con enfermedad de Alzheimer, encuentran un aumento en putamen y núcleo caudado de 192 y 177 %, respectivamente, asociado a una mayor actividad en 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 putamen y núcleo caudado, y el bloqueo constante de los NMDAr está asociado a la pérdida de memoria, aprendizaje y cognición en pacientes con esta enfermedad.

Numerosos han sido los estudios donde el desbalance en la VK se asocia 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. Específicamente se ha reportado que en estadios tempranos de la enfermedad, los niveles de QUIN aumentan y el KYNA permanece constante, pero en pacientes con la enfermedad avanzada, el QUIN se encuentra en concentraciones normales y el KYNA disminuye (Guidetti et al., 2004).

Por otra parte, el KYNA también se encuentra disminuido en cerebros *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Ogawa, 1992). Adicionalmente, se ha observado que en un modelo experimental 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 (Knyihár-Csillik *et al.*, 2004) y la KAT II que conlleva a una disminución en los niveles de KYNA (Luchowski *et al.*, 2002). Esta disminución en KYNA está asociada a la excitotoxicidad observada en este modelo experimental. Así, se asume que el KYNA es incapaz de inhibir los NMDAr para prevenir la excitotoxicidad.

2.2.2 KYNA COMO ANTIOXIDANTE

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 encontraron el primer indicio de que el KYNA posee la capacidad de atrapar OH^\bullet en sistemas no biológicos de producción de este radical. Posteriormente, Hardeland y Zsizsik (1997) mostraron que, mediante detección por quimioluminiscencia, los radicales

$O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} oxidan al KYNA y la adición de atrapadores específicos de estas especies inhibe dicha oxidación. Adicionalmente, Zsizsik and Hardeland (1999a) emplearon un sistema de auto-oxidación de hematoxilina y del sistema ABTS y compararon la capacidad de captura de $O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} por diferentes moléculas incluyendo al KYNA, 4-hidroxiquinolina, ácido quindálico, y ácido xanturénico. KYNA resultó ser más eficiente que la 4-hidroxiquinolina y el ácido quindálico, pero menos eficiente que el ácido xanturénico, al capturar los radicales. Posteriormente, se demuestra que KYNA previene la degradación de 2-desoxiribosa inducida por radicales OH^{\bullet} generados por fotólisis de la N-hidroxi-2-tiopiridona (Zsizsik BK, Hardeland R. 1999b).

Más recientemente Lugo-Huitrón et al. (2011) demostraron que el KYNA es capaz de atrapar anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito, de manera eficiente en sistemas de química combinatoria y que este metabolito es capaz de disminuir la peroxidación de lípidos así como la formación de ERO inducida por $FeSO_4$ en homogenados de cerebro de rata. Estos efectos antioxidantes mostrados por KYNA fueron independientes a su acción antagónica sobre receptores para NMDA.

Adicionalmente, en diferentes modelos experimentales como el de la 6-hidroxidopamina, β -amiloides y ácido quinolínico el empleo del precursor de KYNA en conjunto con un inhibidor del transportador de ácidos orgánicos (probenecid) muestran prevenir el daño neurotóxico inducido por estas toxinas, sugiriendo que KYNA puede estar previniendo a la célula de protección gracias a su carácter modulador de neurotransmisores pero también a su carácter como antioxidante (Carrillo- Mora et al., 2010; Silva-Adaya et al. 2010; Miranda et al., 1997).

2.3 LAS KAT'S Y SU PAPEL EN LA FORMACIÓN DE KYNA A PARTIR DE LA L-KYN

La L-KYN puede entrar al cerebro por un transportador de aminoácidos neutros (Fukui, 1991) y una vez adentro es transportado a los astrocitos y células de la microglia. También puede ser transportado a neuronas pero en menor cantidad, debido a que este transporte es más lento y depende del suministro de Na^+ y se da por un transporte activo.

Las kinurenina aminotransferasas (KAT) son las enzimas encargadas de la formación de KYNA a partir de la L-KYN. Esto se da por la transaminación de la L-KYN, lo cual conlleva a la formación de KYNA y es irreversible. Todas las enzimas que se requieren para la síntesis de KYNA están presentes en el cerebro (Schwarcz et al., 1990; Guidetti et al., 1995). Se ha encontrado una mayor cantidad de aminotransferasas capaces de formar KYNA a partir de kinurenina en órganos periféricos en comparación con el cerebro (Okuno y Kido, 1991), y en humanos se han identificado tres isoformas de KAT (KAT I, KAT II y la KAT III), por lo que la producción de KYNA es compleja (Okuno et al., 1991; Guidetti et al., 1997). Las KAT's difieren en el pH óptimo para ejercer su actividad, la KAT I tiene un pH óptimo de 9.5 a 10, por otro lado la KAT II funciona a pH fisiológico y ambas reconocen a la kinurenina (que se encuentra a concentraciones micromolares en el cerebro) (Schmidt et al., 1993); se sugiere que la KAT II es la principal enzima implicada en la formación de KYNA.

La KAT I se encuentra principalmente expresada en hígado y riñón de humanos y de ratas, además muestra una baja especificidad por su sustrato y puede ser inhibida por otros aminoácidos y no solo por una alta transaminación de L-KYN en el medio (Rossi F. et al. 2008).

En el cerebro, todas las enzimas de la vía de la kinurenina están principalmente expresadas en astrocitos y/o células de la microglia, aparentemente los astrocitos no presentan la kinurenina-3-hidroxilasa que es la enzima encargada de llevar a cabo la formación de 3-HK a partir de la L-KYN, lo cual favorece la formación de KYNA (Guillemin et al., 2001), después de que se formó el KYNA este es liberado al espacio extracelular por un sistema acarreador sensible al probenecid que transporta al KYNA fuera del cerebro (Moroni et al., 1988).

2.4 LOS RATONES KNOCK OUT PARA LA KINURENINA AMINOTRANSFERASA II (KAT II KO) COMO MODELO DE ESTUDIO

Recientemente, se desarrolló un ratón knockout para la kinurenina aminotransferasa II (KO KATII), enzima responsable de la transaminación de kinurenina a KYNA. La destrucción del gen de *kat-2* en ratones por recombinación homóloga, indujo una reducción perinatal de KYNA en el cerebro de los ratones durante el primer mes de edad; sin embargo, dichos niveles retornaron a valores normales. En contraste, la actividad de las kinureninas aminotrasferasas (KAT's) y los niveles de KYNA en hígado disminuyeron >90% a lo largo de la vida de los ratones. La reducción en los niveles de KYNA cerebrales se acompañó por anormalidades conductuales: los ratones llegaron a manifestar hiperactividad y coordinación motora anormal a las 2 semanas de edad, pero ésta se hizo indistinguible de la actividad de los ratones silvestres a los 30 días postnatales (Ping Yu et al., 2004).

La disminución transitoria de KYNA en los ratones KAT II KO fue suficiente para aumentar la actividad de los receptores $\alpha 7nACh$ en CA1, y un incremento de la actividad sináptica GABAérgica de neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo, lo cual sugiere que el aumento en la actividad locomotora observada a los 21 días postnatales es consecuencia del incremento en la actividad GABAérgica del hipocampo (Alkondon et al., 2004). Por otra parte, no se observaron efectos en la viabilidad, longevidad y fertilidad en estos ratones. Cabe resaltar, que dado que los cambios bioquímicos y conductuales en estos ratones knockout fueron transitorios, y mejoraron a las 4 semanas de edad con la completa restauración de los niveles de KYNA cerebrales, se propusieron mecanismos compensatorios que pudieran estar relacionados con las diferentes isoformas de las KAT's (Yu et al., 2004). No obstante, los niveles de ARNm de *Kat-3* y *Kat-1* en los ratones KAT II KO no fueron significativamente mayores al de los silvestres, sugiriendo que mecanismos adicionales e independientes de las diferentes isoformas de KAT's pueden estar regulando la producción de KYNA en el cerebro de ratones adultos. En nuestro estudio estos ratones representan una excelente herramienta para identificar qué mecanismos alternos están presentes en la formación de KYNA.

2.5 RUTAS ALTERNAS DE FORMACIÓN DE KYNA

Otra posible ruta alterna de la biosíntesis de KYNA involucra la transaminación del triptófano por la triptófano aminotransferasa o una aminotransferasa aromática a ácido indol-3-pirúvico (IPA), el cual pasa a su forma enol-tautomérica la cual es capaz de reaccionar con las especies reactivas de oxígeno para formar KYNA (Hardeland, 2001), esta hipótesis es apoyada por un estudio en el que se demuestra que la adición de ácido 3-indol pirúvico a cultivos de *Lingulodinium polyedrum* produce casi instantáneamente KYNA en un proceso que se favorece en presencia de luz; sin embargo bajo estas mismas condiciones el empleo de un inhibidor del fotosistema II, que favorece la formación de ERO, estimula aún más la generación de KYNA por lo que estos proponen una vía alterna para la formación de KYNA que involucra a las ERO (Hardeland, 2001). Sin embargo, estas rutas descritas para la formación de KYNA no son suficientes para explicar la producción de este metabolito en grandes cantidades cuando la kinurenina es adicionada a algún medio biológico.

En concordancia con Hardeland y cols., nuestro grupo ha encontrado un aumento en los niveles de KYNA en medios de química combinatoria en los cuales se producen principalmente peroxinitrito (ONOO^-) y el radical hidroxilo (OH^\bullet), sugiriendo de esta manera que la interacción de L- y D-kinurenina con estas especies reactivas promueven la formación de KYNA. En este trabajo también se observó la formación de KYNA a partir de la interacción de la L- y D- kinurenina con las ERO en homogenados de cerebro y cerebelo de rata, y además se realizó una propuesta sobre los pasos involucrados en la reacción entre la KYN y las ERO (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. (Lugo et al. 2014)

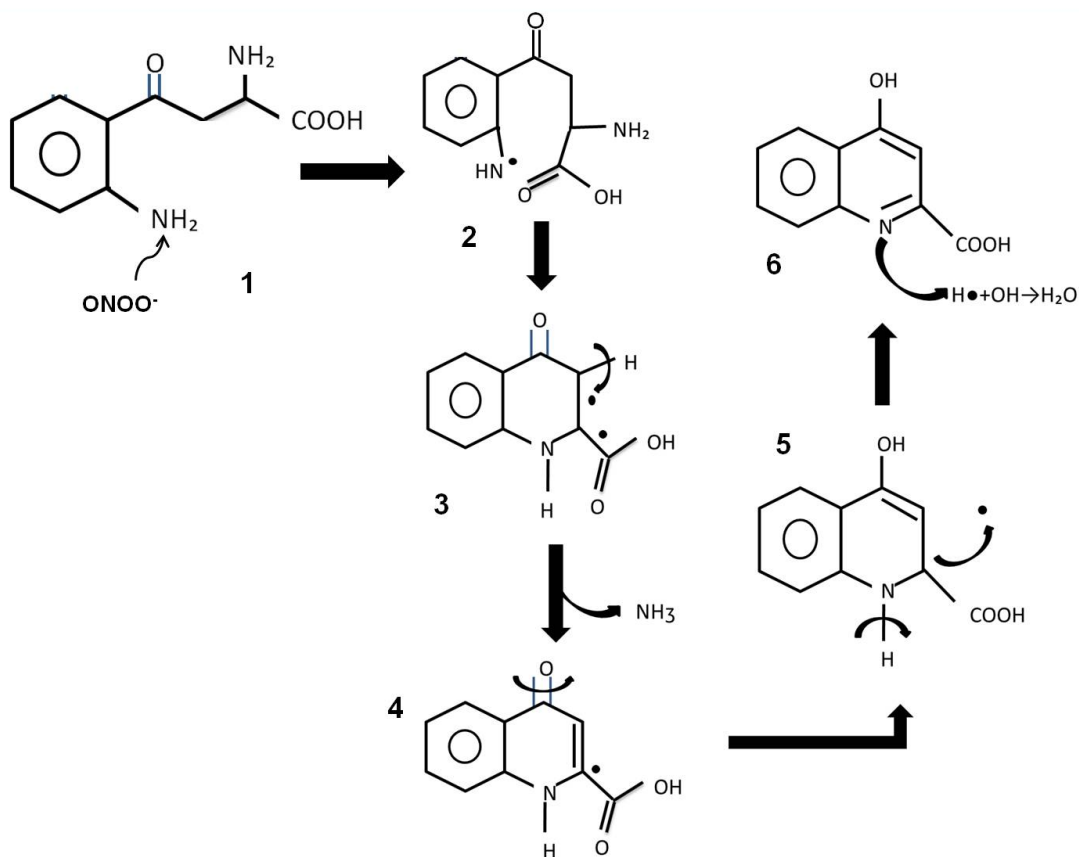


Figura 2. Formación de KYNA a partir de la reacción entre la L-KYN y el ONOO . (Tomada de Lugo-Huitrón 2014)

Adicionalmente, se ha sugerido que los D-aminoácidos podrían también ser fuente de formación de KYNA, en este contexto, Fukushima y colaboradores (2008) encontraron un incremento en los niveles plasmáticos de KYNA después de la administración intraperitoneal de D-KYN. Estos autores encontraron que el valor de T_{max} en plasma para KYNA se alcanzó a los 5 minutos después de la administración de D-KYN, lo cual a su vez

sugiere que la transformación de D-KYN a KYNA ocurre muy rápidamente. Más aún, la administración de un inhibidor de la D-amino oxidasa (DAO) suprimió solo parcialmente la producción de KYNA (Fukushima et al., 2008). Más recientemente se demostró que la infusión de D-KYN aumenta los niveles de KYNA en estriado de rata; el empleo del ácido amino-oxiacético (AOAA), un inhibidor inespecífico de las kinurenina aminotransferasas, disminuye solo un 30% esta producción, mientras que con la L-KYN este inhibidor bloquea completamente la biosíntesis de KYNA (Pérez-de la Cruz et al., 2011). Todas estas observaciones sugieren la posibilidad de que existan nuevas rutas de formación de KYNA las cuales pueden estar presentes en condiciones normales y que pueden exacerbarse en condiciones patológicas.

2.6 EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITROGENO

El estrés oxidativo se define como el desbalance entre la formación de radicales y especies reactivas que 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 $OH^{\bullet-}$, 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 se refiere a una serie de eventos tóxicos producidos a nivel molecular por radicales derivados del nitrógeno y moléculas reactivas como el óxido nítrico (NO) y el $ONOO^-$. El sistema nervioso central (SNC) es particularmente susceptible a los efectos de las ERO/ERN debido a su elevada proporción de lípidos con respecto a otros órganos y 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.

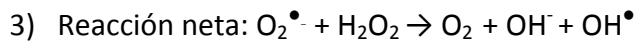
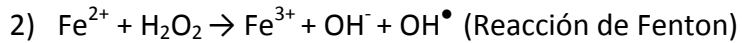
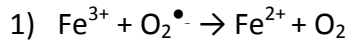
Un radical libre es una especie química que puede existir de manera independiente y que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por la pérdida o por la ganancia de ellos. Estos electrones desapareados modifican la reactividad química de átomos o moléculas y las hacen más reactivas que su correspondiente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

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno.

Radicales	No radicales
Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	Ácido hipocloroso (HCl)
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 OH^{\bullet} , y la mayor fuente de estas especies es la cadena respiratoria.

El OH^\bullet 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 sus fuentes de producción varían en la célula. 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^{++} y libera el ácido araquidónico, mismo que es oxidado por la ciclooxigenasa 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 OH^\bullet puede formarse a partir de ONOO^- , ya que este se protona rápidamente para formar ácido peroxinitroso (ONOOH), y la descomposición espontánea de éste, genera OH^\bullet .

El estrés nitrosativo es generado por la rápida oxidación del ON. El ON puede reaccionar con diversas moléculas y dar lugar a la generación de otra especie muy agresiva, el ONOO^- .

2.6.1 DAÑO OXIDATIVO A MACROMOLÉCULAS Y LOS PRINCIPALES MECANISMOS ANTIOXIDANTES

La producción de ERO es 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. El sistema nervioso es notablemente susceptible al daño a lípidos dada su gran cantidad presente en membranas, el efecto directo de las ERO sobre los lípidos es la lipoperoxidación. Los radicales OH^\bullet e hidroperoxilo (HO_2^\bullet), así como el $^1\text{O}_2$, pueden reaccionar con los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens y Dix, 1991; Choe et al., 1995; Choi y Yu, 1995; Gutteridge y Halliwell, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1984; Horton y Fairhurst, 1987; Niki et al., 1991; Schaich, 1992).

Por otro lado las ERO, pueden dañar a las proteínas, alterando no sólo su estructura, sino también su función, 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.

El DNA también puede dañarse por efecto de las ERO, ya que estas especies reactivas reaccionan con la desoxirribosa y las bases nitrogenadas. Existen diversos sistemas de reparación del DNA ya que estas especies presentan niveles basales en la célula (Lindahl y Wood, 1999); no obstante, si las ERO se producen en sitios críticos o no son reparados rápidamente, puede tener consecuencias perjudiciales que van desde producir mutaciones hasta la apoptosis, la necrosis, e incluso la carcinogénesis (Klaunig et al., 1998). 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.

A pesar de que estas ERO y ERN pueden causar daño a diversas biomoléculas, dicho daño es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y principalmente por las defensas antioxidantes endógenas o enzimáticas, que consisten en sistemas destinados a convertir las ERO en especies menos reactivas o menos dañinas para el organismo.

Una de estas enzimas de defensa es la superóxido dismutasa (SOD), esta es una metaloproteína cuya función es catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 . La SOD presenta tres isoformas, de las cuales dos tienen en su sitio activo Cu^{2+} y Zn^{2+} ; una de ellas se localiza en el citosol, en el núcleo y en menor cantidad en el espacio intramembranal, y la otra se ubica extracelularmente en fluidos como el plasma (Oury et al., 1996). La tercera isoforma tiene en su sitio activo al Mn^{2+} y se encuentra en la matriz mitocondrial.

La catalasa es una hemoproteína ampliamente distribuida en órganos como el hígado y el riñón y se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias; su papel antioxidante consiste en disminuir el riesgo de formación del $\bullet OH$ por la interacción del H_2O_2 con metales de transición vía la reacción de Fenton (Halliwell, 1999).

Sin embargo en el SNC el principal encargado de la degradación del H_2O_2 es el sistema glutatión, el papel del GSH (glutatión reducido), como un agente reductor es importante, especialmente en un entorno altamente oxidante. El sulfhidrilo del GSH se puede utilizar para reducir los peróxidos. La forma resultante de glutatión oxidado consta de dos moléculas unidas entre si por un enlace disulfuro (GSSG) (Selva Rivas-Arancibia et al. 2011). Este sistema depende de dos enzimas que en conjunto llevan a cabo la oxidación y reducción del glutatión. Una de ellas es la glutatión peroxidasa es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. Esta es eficiente en la degradación de H_2O_2 y requiere de la presencia de GSH para poder llevar a cabo su actividad catalítica (Powers & Lennon, 1999). La Glutatión reductasa es una enzima que requiere NADPH y cataliza la conversión de GSSG a GSH. Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de esta molécula (Harris & Massey, 1992). (ver figura 3)

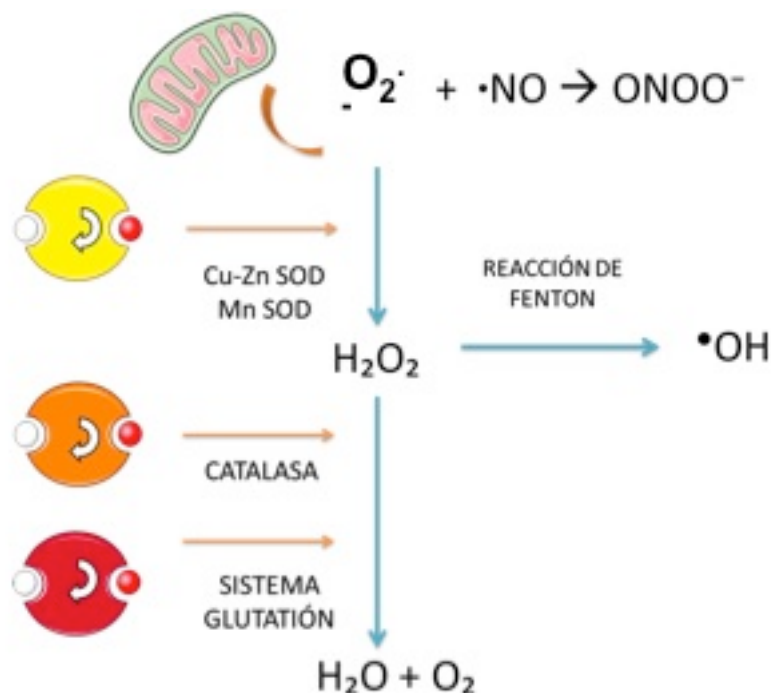


Figura 3. Principales especies reactivas y sistemas antioxidantes.

2.7 3-NITROPROPIONICO COMO MODELO DE DAÑO OXIDATIVO Y TOXICIDAD

El 3-NP es una micotoxina que causa neurotoxicidad (Ludolph et al., 1991) y es un inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa, la cual es parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena de transporte de electrones (Alston et al., 1977; Coles et al. 1979). El 3-NP es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que puede ser administrado sistémicamente

Las lesiones cerebrales causadas por la administración sistémica del 3-NP son altamente específicas del estriado, aunque también se han encontrado en hipocampo, tálamo y corteza cerebral (Borlongan et al., 1997). El mecanismo primario de esta toxina involucra la inhibición de la succinato deshidrogenasa, una enzima localizada en el interior de la membrana mitocondrial y la cual es responsable de la oxidación del succinato a fumarato,

llevando a la reducción de la síntesis de ATP y a la muerte neuronal, (Túnez et al., 2004; Coles et al., 1979).

El bloqueo de la actividad mitocondrial está a su vez íntimamente asociado con la formación de ERO. La inhibición de enzimas en la cadena de transporte de electrones puede llevar a un incremento en la fuga de los mismos desde la mitocondria y la consecuente producción de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$. Por otro lado Herrera Mundo en el 2006 observo que la administración intraperitoneal de 3-NP (30mg/kg), es capaz de provocar una disminución en la actividad de la enzima superoxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) así como de la dependiente de cobre (Cu-Zn-SOD), también es capaz de aumentar la peroxidación de lípidos (PL) y producir una disfunción mitocondrial.

Además se ha visto que cuando se tratan rebanadas de corteza con 3-NP se ve afectada la actividad de la KAT I y la KAT II, lo que lleva a una disminución en la formación de KYNA (Luchowski P et al. 2006), Por otro lado Anita Csillik y colaboradores en el 2012 demostraron que después de 15 días de administración de 3-NP, la mayor disminución de la actividad de la KAT se produjo en el estriado; seguido de otras regiones cerebrales estudiadas donde la depleción de la actividad de esta enzima no fue tan drástica; estriado > hipocampo > y corteza temporal respectivamente. Además las alteraciones inducidas por el tratamiento con 3-NP eran menos visibles en animales jóvenes de 6 semanas de edad en comparación con los animales adultos de 3 meses de edad ya que en este grupo se observó la formación de núcleos necróticos en el cuerpo estriado, que se caracterizan por la destrucción de elementos neuronales y gliales.

Aunado a esto estudios empleando microdiálisis mostraron un incremento no significativo en las concentraciones extracelulares de glutamato después de la administración de dosis neurotóxicas de 3-NP, en contraste con un marcado incremento en la concentración de lactato (Wullner et al., 1994; Beal, 1994). Estos resultados muestran que el 3-NP causa excitotoxicidad haciendo a las neuronas más vulnerables a los niveles endógenos de glutamato. Adicionalmente, se sabe que el 3-NP *in vitro* altera la homeostasis del Ca^{2+}

involucrando la excitotoxicidad, que ha sido vinculada con la generación de ERO (Lafon-Cazal et al., 1993; Alexi et al., 1998).

Por lo tanto dado que los mecanismos que gobiernan la formación y disposición de KYNA en el cerebro no han sido descritos ni explorados por completo, y en consideración a la importancia que tienen las variaciones en los niveles de KYNA, y los demás metabolitos de la VK en diversos desórdenes, resulta fundamental establecer estrategias experimentales orientadas a la evaluación de las posibles vías alternas de formación de estos metabolitos y como están involucrados en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos en el cerebro. Es por ello que en este proyecto se caracterizaron las vías de síntesis alternativas de KYNA en los ratones KAT II KO en los cuales se ha observado producción de KYNA sin que alguna de las isoformas de las KAT's estén involucradas.

3. HIPOTESIS

Dado que la producción de KYNA no ocurre exclusivamente a partir de la actividad de las KAT's, entonces la formación de este metabolito puede depender de vías alternas de síntesis que pueden involucrar a la L- kinurenina y el estrés oxidante. Si los ratones KAT II KO presentan alteraciones en sus defensas antioxidantes, entonces en estos ratones la administración de L-kinurenina en presencia de ERO llevarán a un incremento en la producción de KYNA.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el perfil antioxidante de los ratones KAT II KO así como los mecanismos alternativos de formación de KYNA.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar y comparar la producción de KYNA en diferentes regiones cerebrales en ratones KAT II KO y establecer si hay diferencias a diferentes edades.
2. Evaluar el efecto de L-KYN sobre la producción de KYNA en ratones KAT II KO y compararlos con ratones WT.
3. Caracterizar el perfil de enzimas antioxidantes en los ratones KAT II KO a edad temprana a través de la actividad de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión transferasa y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido.
4. Determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación como marcadores de estrés oxidante en los ratones KAT II KO y WT tratados con 3NP (ácido 3-nitropropiónico) solo y en combinación con L-KYN.
5. Evaluar el efecto de la administración intraperitoneal de 3-NP; en la generación de KYNA empleando como sustrato L- kinurenina.

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).

Los ratones KO KAT-II se obtendrán por donación del Dr. Robert Schwarcz de la Universidad de Maryland en Baltimore.

Se utilizaron ratones silvestres y KO KAT-II de diferentes edades. 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).

Se utilizaron ratones de 28 días de edad de ambos genotipos ya que a esta edad se ha reportado que estos ratones presentan bajos niveles de KYNA (Ping Yu et al, 2004) así como de 28 meses de edad para la evaluación de KYNA

5.1.1 CARACTERIZACIÓN DE RATONES KATII KO Y SILVESTRES

Los genotipos determinaron por PCR empleando dos pares de oligos del gen *KATII KO* tanto WT como *mkat-2^{-/-}* para todos los ratones analizados, con las secuencias (5'-3'):

WT

Oligo1: ACATGCTCGGGTTTGGAGAT

Oligo 2: AAGCTTTGGA ACTCTAGTGGG

KATII KO.

Oligo 3: GAGACAGACGCTTGATACT

Oligo 4: GTGGATGTGGAATGTGTGCG

Para la extracción de ADN se cortaron 0.5 cm de cola a cada ratón, y se cual se incubaron durante toda la noche a 55°C en 500 μl de amortiguador de lisis que contenía Tris 100 mM (pH 8.5), EDTA 5 mM, SDS 0.2%, NaCl 200 mM y proteinasa K 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se agregaron 500 μl de isopropanol frío y se mezcló hasta observar el precipitado de ADN. Posteriormente, las muestras se centrifugarón a 14,000 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante para posteriormente resuspender en agua estéril. Para la reacción se cargaron 100 ng de ADN en amortiguador con MgCl y amonio,

con cada juego de oligos (Oligos 1 con 2 y 3 con 4) 0.1 μ M cada uno, añadiendo 0.6 U de Taq ADN polimerasa (Ampliqon, Odense, Dinamarca). Los parámetros de termociclado se ajustaron de la siguiente manera: 2 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 58°C y 1 min a 72°C. Al finalizar el ciclo de reacción, se cargaron 5 μ l del amplificado en geles de agarosa al 0.8 % con bromuro de etidio y se corrieron durante 45 min a 50 v. Las bandas de los amplificados se observan entre 1.4 y 1.7 kb y se determina qué par de oligos amplificó la secuencia.

5.1.2 NIVELES DE KYNA, PERFIL ANTIOXIDANTE Y ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE L-KYNURENINA Y 3-NP

Ratones silvestres y KAT II KO de 28 días de edad fueron sacrificados para obtener las diferentes regiones cerebrales para la caracterización de los niveles de KYNA totales, actividades enzimáticas y perfil oxidante. Adicionalmente a otro grupo de ratones silvestres y KO KATII fueron administrados intraperitonealmente con L- KYN (30mg/Kg) y después de 30 minutos de la administración, se obtuvieron las diferentes regiones cerebrales así como órganos periféricos (estriado, hipocampo, corteza, cerebelo, hígado y riñón) para determinar la producción de KYNA. En paralelo, a un segundo grupo de ratones se le administro 3-NP (30 mg/kg i.p.) y 2 horas después de la administración de las toxinas se obtuvieron los tejidos de los animales para evaluar los niveles de KYNA y ensayos bioquímicos. Todas estas regiones fueron preservadas a -70°C, hasta su procesamiento (Figura 4). Las dosis de 3-NP y tiempo de sacrificio se basaron en el trabajo de Herrera Mundo et al. 2006 en el que la administración intraperitoneal a esta dosis y tiempo fue capaz de aumentar la peroxidación de lípidos (PL) e inducir una disfunción mitocondrial.

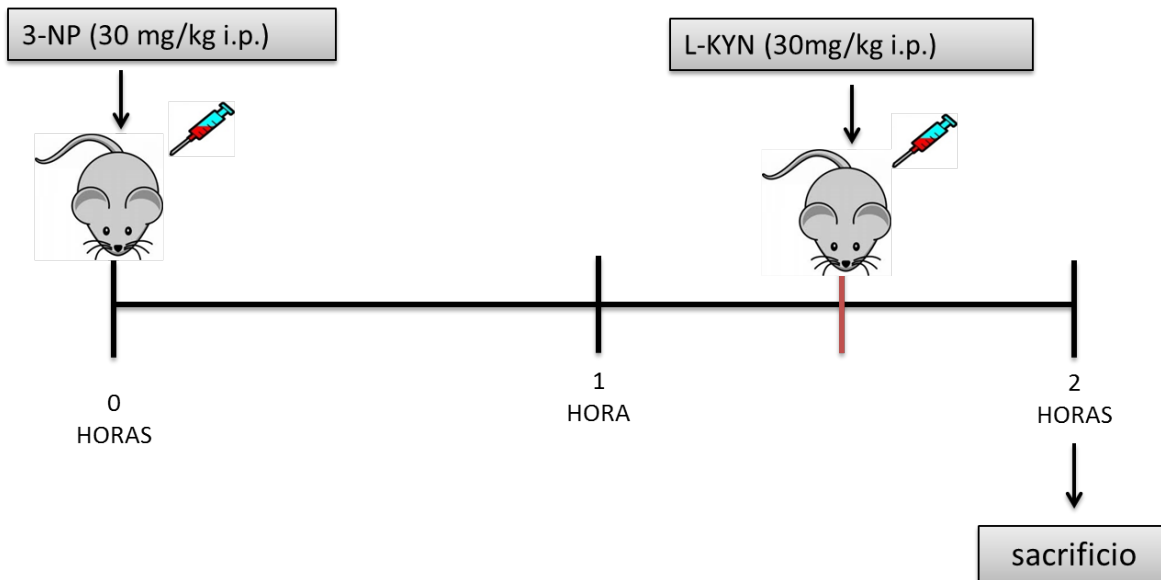


Figura 4. Esquema de administración de 3-NP (30mg/kg) y L-KYN (30mg/kg).

5.2 PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS

Para realizar las diferentes pruebas se emplearon los homogenados de tejido extraído, la corteza, cerebelo, estriado, hipocampo hígado y riñón, se homogenizaron 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).

5.3 DETECCIÓN DE KYNA POR HPLC

La presencia de KYNA fue evaluada por cromatografía líquida de alta resolución acorde a lo reportado por Pérez de la Cruz et al. 2011, 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 en un flujo

de 1 ml / min con fase isocrática. El tiempo de retención de KYNA es en el minuto 7 y se detectó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 344 nm y de emisión 398 nm. detector de fluorescencia 200^a (PerkinElmer, Connecticut, USA). Para esta prueba se homogenizaron las diferentes regiones extraídas de ratones *KATII KO* y WT, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm y se utilizaron 20µl del sobrenadante para determinar KYNA. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

5.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

La formación de ERO se evaluó por la fluorescencia de la DCF (Ali, LeBel et al. 1992; Herrera-Mundo and Sitges 2010), se utilizaron homogenados de las regiones a evaluar, se utilizaron 60µl de muestra y se llevaron a un volumen final de 200µl con buffer Krebs, se agregaron 10µL de una solución de diclorofluoresceína-diacetato (DCF₂DA) a 75 µM, la formación de ERO se detectó por fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF), las muestras se centrifugaron a 6,000 x g por 10 min, y la señal fluorescente de la DCF de los sobrenadantes se determinó en un lector de placas de fluorescencia Biotek con 480 nm de excitación y 528 de emisión. Los datos fueron corregidos por una curva patrón de DCF y la cantidad de proteína para cada muestra.

5.5 DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La peroxidación de lípidos se evaluó por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo a lo reportado previamente por (Perez-De La Cruz, Elinos-Calderon et al. 2010) se tomaron 120µL del homogenado de las diferentes regiones y se adicionaron 60µL de buffer Krebs y 120µL del reactivo TBA (0.75g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 de HCl concentrado). La solución final se colocó en un baño de ebullición (94°C) durante 20 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a

3,000 x g por 15 min y la densidad óptica del sobrenadante se determinó con un lector de placas Biotek a una longitud de onda de 532 nm. La concentración de TBARS de cada muestra se determinó en base a una curva estándar a partir de un stock de malondialdehído al 1 mM. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

5.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR LOWRY

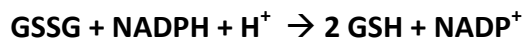
Para la determinación de proteína se utilizaron 20 µl de muestra en una dilución 1:100 y se le agregaron 340 µl de solución C que se compone de 50ml de reactivo A (Na₂CO₃ 2% en NaOH 0,1N) y 1ml de reactivo B (CuSO₄ 0.5% en tartrato de sodio y potasio 1%). Una vez agregada la solución C se mezclaron bien las muestras y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de solución de follin 1:2 y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, la absorbancia se obtuvo en un lector de placas Biotek a una longitud de onda de 550 nm. La concentración de proteína de cada muestra se determinó en base a una curva estándar de BSA al 0.05%.

5.7 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)

Para la determinación de los niveles de glutatión (GSH) se utilizó un KIT de detección por fluorescencia (Glutathione Detection Assay Kit Fluorometric; Abcam ab65322). Cada muestra se homogenizó en un buffer de lisis y fue centrifugada a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a placas de 96 pozos. A cada muestra se le agregó 2µl del reactivo Glutatión S-transferasa y 2µl de monoclorobimano (MCB), la placa se incubó durante una hora a 37°C. La fluorescencia se evaluó en un lector de placas Biotek a una longitud de onda de Ex/Em. = 360 ± 20 nm/ 460 ± 20 nm. La concentración de glutatión de cada muestra se determinó en base a una curva estándar de glutatión reducido GSH. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

5.7.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA

La actividad de la enzima glutatión reductasa fue determinada siguiendo la oxidación del NADPH a NADP^+ durante la reducción del glutatión oxidado (GSSG) siguiendo el método reportado por (Andersen et al., 1997).



El reactivo principal fue preparado mediante la combinación de 18 ml de buffer KH_2PO_4 (.5M), EDTA (1 mM) pH 7.8, y NADPH (10 mM). Se colocaron 50 ml de la muestra, más 100 ml del regulador de KH_2PO_4 , 810 ml de H_2O y 20 ml NADPH fueron adicionados a un pozo y monitoreo la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos con lecturas cada 20 segundos (Paso A). Después se adiciono a la muestra 20 ml de GSSG (10mM) para iniciar la reacción se midió la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos tomando lecturas cada 20 segundos desde el inicio de la reacción. (Paso B). La diferencia en absorbancia por minuto entre el paso B y el paso A se utiliza para calcular la actividad enzimática conociendo la absorción molar del NADPH. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína. Los resultados se reportan en nmol/mg de proteína.

5.7.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad de la enzima fue medida siguiendo la oxidación del NADPH a NADP^+ . La actividad de la enzima fue medida a través del procedimiento reportado por (Paglia and Valentine 1967). Para esto se utilizó un buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.1, EDTA 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 EU/ml de glutatión reductasa y 1 mM GSH. Estos reactivos fueron preparados al inicio de cada día. Se utilizaron 50 μl de homogenado en un volumen final de 300 μl , se inició la reacción con la adición de 100 μl de una solución de peróxido de

hidrógeno (0.25 mM). Las muestras se leyeron cada 15 segundos a 340 nm durante 5 minutos y la actividad se calculó a partir de la pendiente de la curva que representa los nanomoles de NADPH oxidados por mg de proteína. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

5.7.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA

La actividad de la superoxido dismutasa se determinó por el cambio de color de coloración del nitroazul de tetrazolio al ser reducido por los iones superoxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa reportado por (González-Reyes et al. 2013). La enzima superoxido dismutasa, metaboliza los iones superoxido generados por el sistema antes mencionado y de esta manera compete por el NBT por estos iones por lo que la actividad de la superoxido dismutasa es directamente proporcional al grado de inhibición del NBT. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos para todas las muestras se colocó 160µl de la Mezcla que contenía xantina 0.122mM, EDTA 0.122mM, NBT 30.6µM, Albúmina al 0.006% y Na₂CO₃ 49mM, después se agregaron 33µl de sobrenadante de la muestra a evaluar y 3.3µl de xantina oxidasa 0.08U/mg sólido, las muestras se incubaron durante 30 min a 27°C para detener la reacción se adiciono a cada tubo 66µl de CuCl₂ para detener la reacción las muestras se leyeron a 560nm en un lector de placas Biotek a una longitud de onda de 560nm. Para cada muestra se incluyo un tubo blanco que tenía todo excepto muestra, el volumen de la muestra fue remplazado con amortiguador de fosfatos 50mM, así mismo se corrió un blanco problema que tenía muestra pero no se le agregaba xantina oxidasa. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE RATONES KO KATII Y SILVESTRES

El genotipo de los ratones se caracterizó por PCR empleando los dos pares de oligos como se mencionó en la metodología. Posteriormente los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio obteniendo las bandas correspondientes para cada genotipo (figura 5).

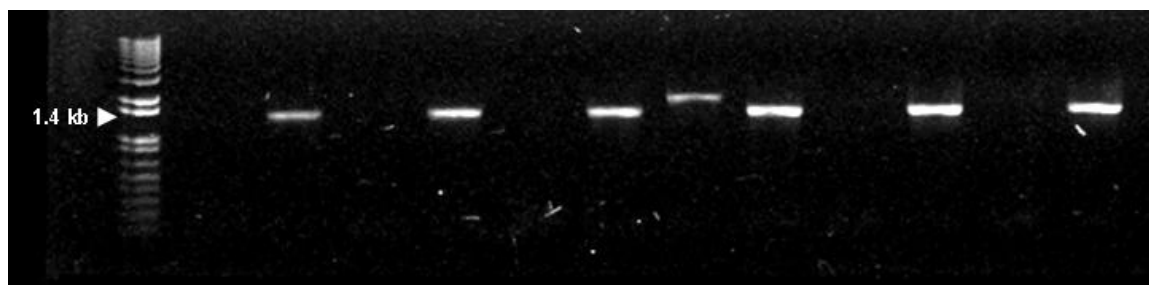


Figura 5. Imagen del gel con los productos de PCR para la caracterización de los ratones. Cada muestra de ADN se probó con ambos pares de oligos, donde sólo amplificó el oligo con el genotipo correspondiente. Los fragmentos amplificados son de 1.7 kb para WT y 1.4 kb para KO.

Una vez que se caracterizaron los ratones KAT II KO se aislaron de los ratones silvestres.

6.1.1 DETERMINACIÓN DE KYNA EN LOS RATONES *KO KATII* A DIFERENTES EDADES

Se determinaron los niveles de KYNA en hipocampo, estriado, cerebelo, corteza, hígado y riñón en ratones *KO KATII* así como WT de 28 días y 28 meses de edad. En base a los datos obtenidos podemos argumentar que los ratones *KO KATII* presentaron una disminución de KYNA en todas las regiones evaluadas con respecto a los WT, excepto en el riñón ya que los valores de KYNA obtenidos para ambos ratones fueron muy similares.

En los ratones *KO KATII* de 28 días hay una mayor cantidad de KYNA en el hipocampo comparado con las otras regiones cerebrales, aunque no mostraron tener diferencias significativas entre éstas, mientras que en los ratones WT los niveles más altos de KYNA se encontraron en el hipocampo y el cerebelo. Por otro lado se pudo observar un aumento

en los niveles de KYNA conforme aumenta la edad de los ratones, hasta alcanzar los mismos niveles que los ratones WT a los 28 meses de edad, sin embargo los niveles de KYNA en el hígado se mantienen bajos aún en este tiempo.

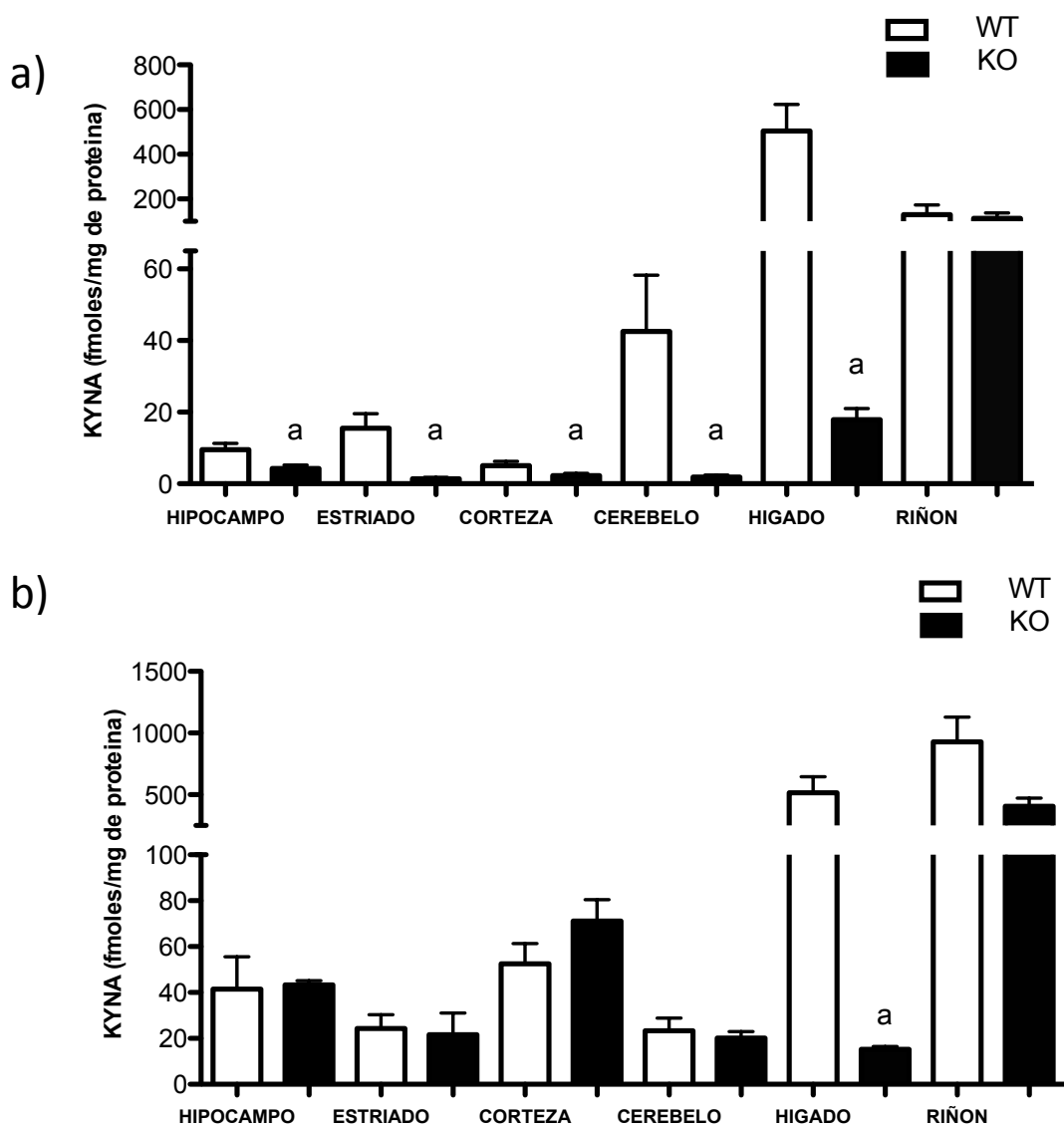


Fig. 6. Determinación de KYNA en los ratones *KO KATII* y WT a los 28 días (a) y de 28 meses de edad (b) Los valores están expresados en promedio \pm ESM $n=6$, ^a $p < 0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student.

6.1.2 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ANTIOXIDANTE DE LOS RATONES KO KATII

Se evaluó la producción basal de especies reactivas del oxígeno y peroxidación lipídica por regiones en ambos genotipos de ratones. Pudimos observar que los ratones KO KATII presentan una mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno, así como peroxidación de lípidos de manera basal (Fig 7 y 8). Estas diferencias fueron significativas al comparar los ratones KO KATII contra los WT a excepción del cerebelo respecto a especies reactivas (Fig 7), ya que en éste no se observaron cambios en los niveles de ERO en ambos ratones

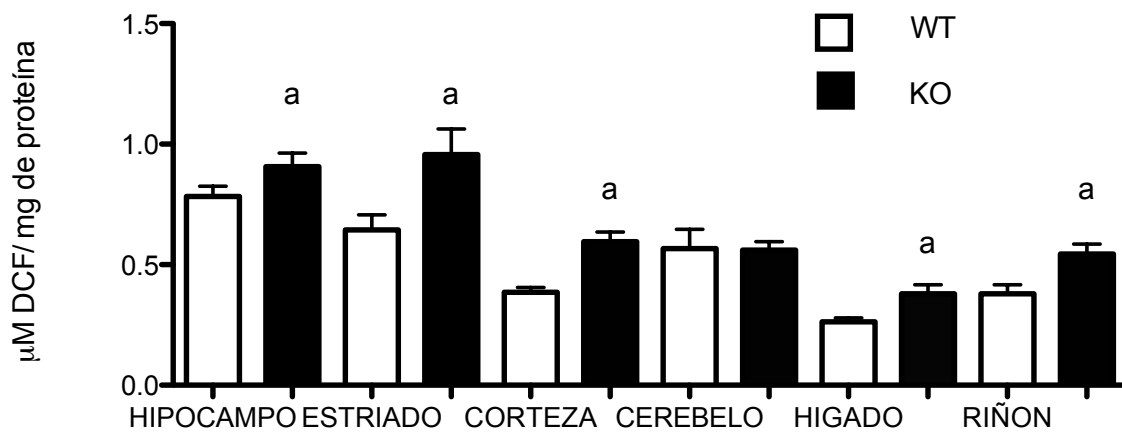


Fig 7. Niveles basales de producción de especies reactivas del oxígeno en los ratones KO KATII y WT a los 28 días de edad. Los valores están expresados en promedio \pm E.S.M. $n=6$, ^a $p < 0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student

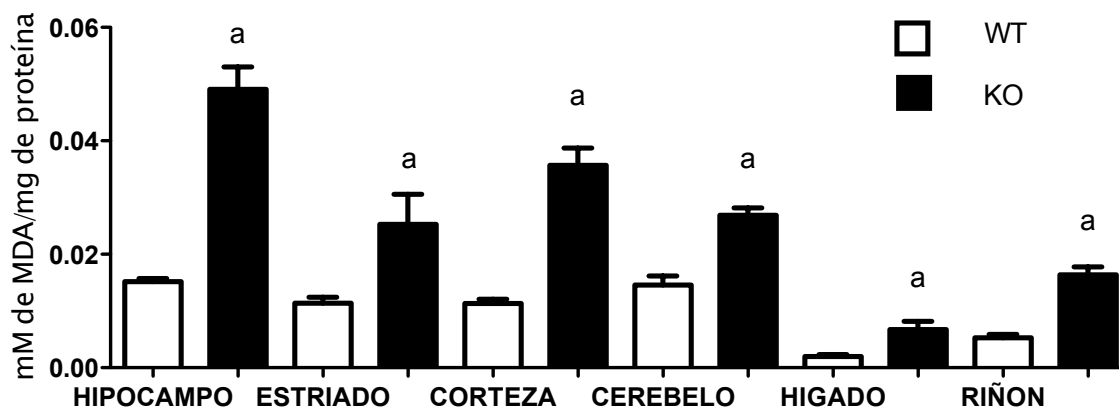


Fig. 8 Niveles basales de peroxidación de lípidos en los ratones KO KATII y WT a los 28 días de edad. Los valores están expresados en promedio \pm E.S.M. $n=6$, ^a $p<0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student

Se midió la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en los ratones KO KATII y WT (Fig. 9). Observamos que los ratones KO KAT II mostraron una menor actividad en el hipocampo y estriado sin embargo en el riñón la actividad de la SOD fue mayor. En las demás regiones evaluadas no hubo diferencias significativas entre ambos tipos de ratones. Aunque se observó una tendencia a ser menores en los ratones KO KAT II.

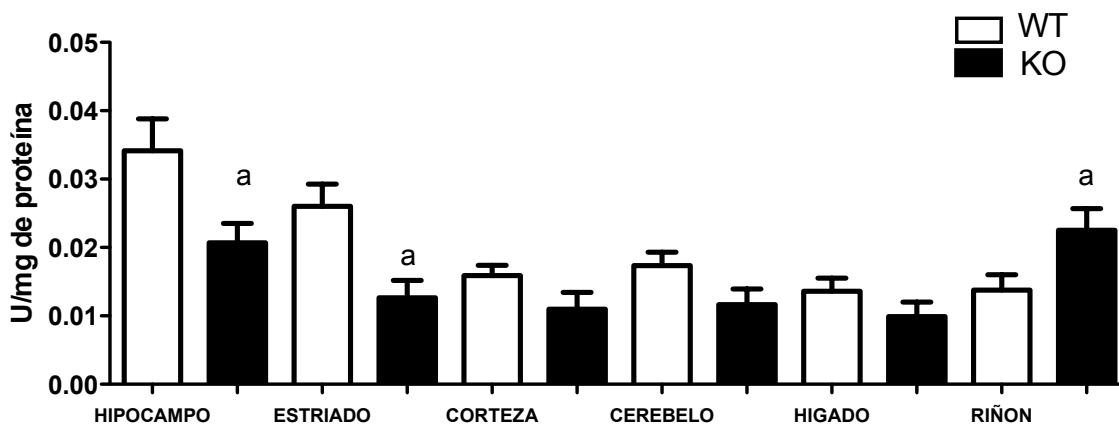


Fig. 9 Actividad de la superóxido dismutasa en los ratones KO KATII y WT a los 28 días de edad. Los valores están expresados en promedio \pm E.S.M. $n=6$, ^a $p<0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student

Aunado a esto se evaluó la actividad de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, enzimas clave que participan en el ciclo del glutatión. En lo que respecta a la actividad de la glutatión reductasa (Fig 10), se observó que en el hipocampo de los ratones KO KATII la actividad de esta enzima se encuentra significativamente disminuida con respecto a los ratones WT, sin embargo no se observaron cambios en las demás regiones evaluadas.

Por otro lado al evaluar la actividad de la glutatión peroxidasa (figura 11) observamos en el hipocampo y corteza de los ratones KO KATII la actividad de esta enzima se encontraba significativamente disminuida con respecto a la actividad en los ratones WT. Sin embargo el cerebelo y estriado de estos ratones, mostraron una mayor actividad y este incremento fue significativo con respecto a los ratones WT.

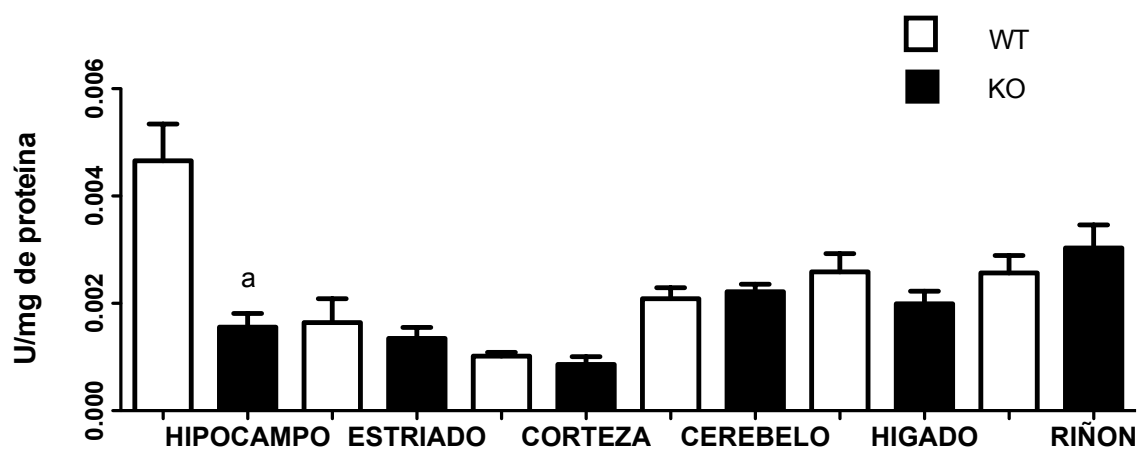


Fig. 10 Actividad de la glutatión reductasa en los ratones KO KATII y WT a los 28 días de edad. Los valores están expresados en promedio \pm E.S.M. $n=6$, ^a $p<0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student

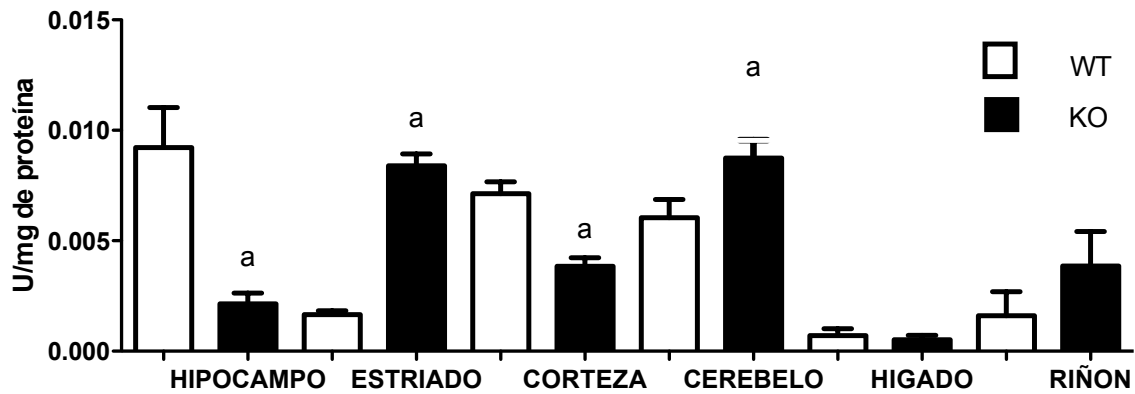


Fig. 11 Actividad de la glutatión peroxidasa en los ratones KO *KATII* y WT a los 28 días de edad. Los valores están expresados en promedio \pm E.S.M. $n=6$, ^a $p<0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student.

A la par se evaluaron los niveles de glutatión reducido (GSH) (figura 12). Se observaron niveles más altos de GSH en la corteza, cerebelo e hígado de ratones *KO KATII* de 28 días comparados con los WT de la misma edad. Sin embargo en lo que respecta al riñón los niveles fueron bajos en los ratones *KO KATII* al comparar ambos genotipos.

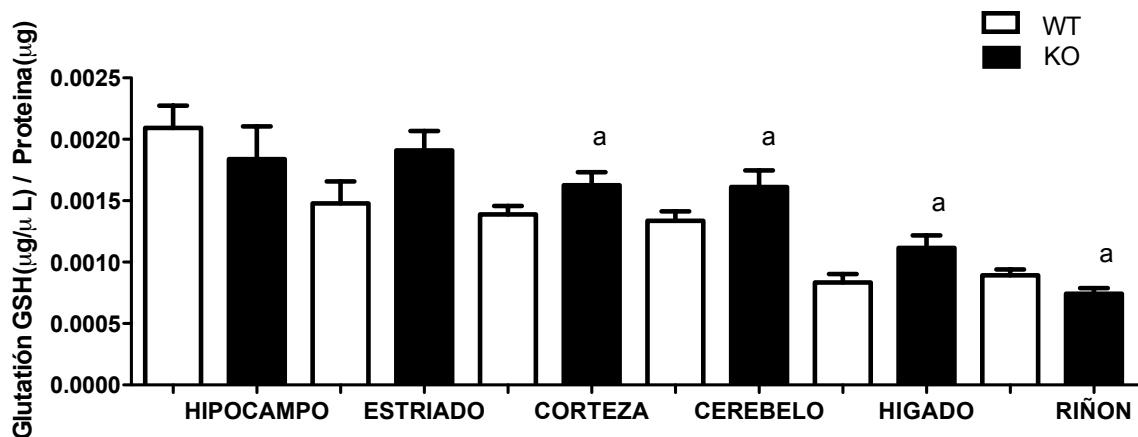


Fig.12 Niveles de glutatión reducido en los ratones *KO KATII* y WT a los 28 días de edad. Los valores están expresados en promedio \pm E.S.M. $n=6$, ^a $p<0.05$ vs WT. Se utilizó una T de student

6.1.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 3-NP Y L-KYN EN LA FORMACIÓN DE ERO Y EN LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

En paralelo realizamos la evaluación de producción de ERO en homogenados de las regiones obtenidas de los ratones *KO KATII* y WT administrados previamente.

En los ratones WT la administración de 3-NP indujo un aumento significativo en la formación de ERO con respecto al control y este efecto se observó en todas las regiones evaluadas y para todas las regiones la administración de la L-KYN en conjunto con el 3NP trajo consigo una disminución en la formación de ERO.

Para el caso de los ratones *KO KATII* el 3NP también indujo un significativo aumento en la formación de ERO y aunado a esto la administración con L-KYN indujo una disminución significativa en la formación de ERO evocado por 3-NP en estas mismas regiones. (Fig. 13-18).

De igual manera se evaluó la peroxidación de lípidos (PL) a las mismas muestras a las que se les evaluó producción de ERO. Los resultados obtenidos muestran que en los ratones WT la administración de 3NP indujo un aumento significativo en la PL para todas las regiones excepto el riñón y la administración conjunta con L-KYN disminuyó la PL excepto en el hipocampo. Mientras que en el caso de los ratones *KO KATII* la administración de 3-NP indujo un aumento en la PL en todas las regiones evaluadas, sin embargo para todos los casos la administración de L-KYN disminuyó significativamente la PL.

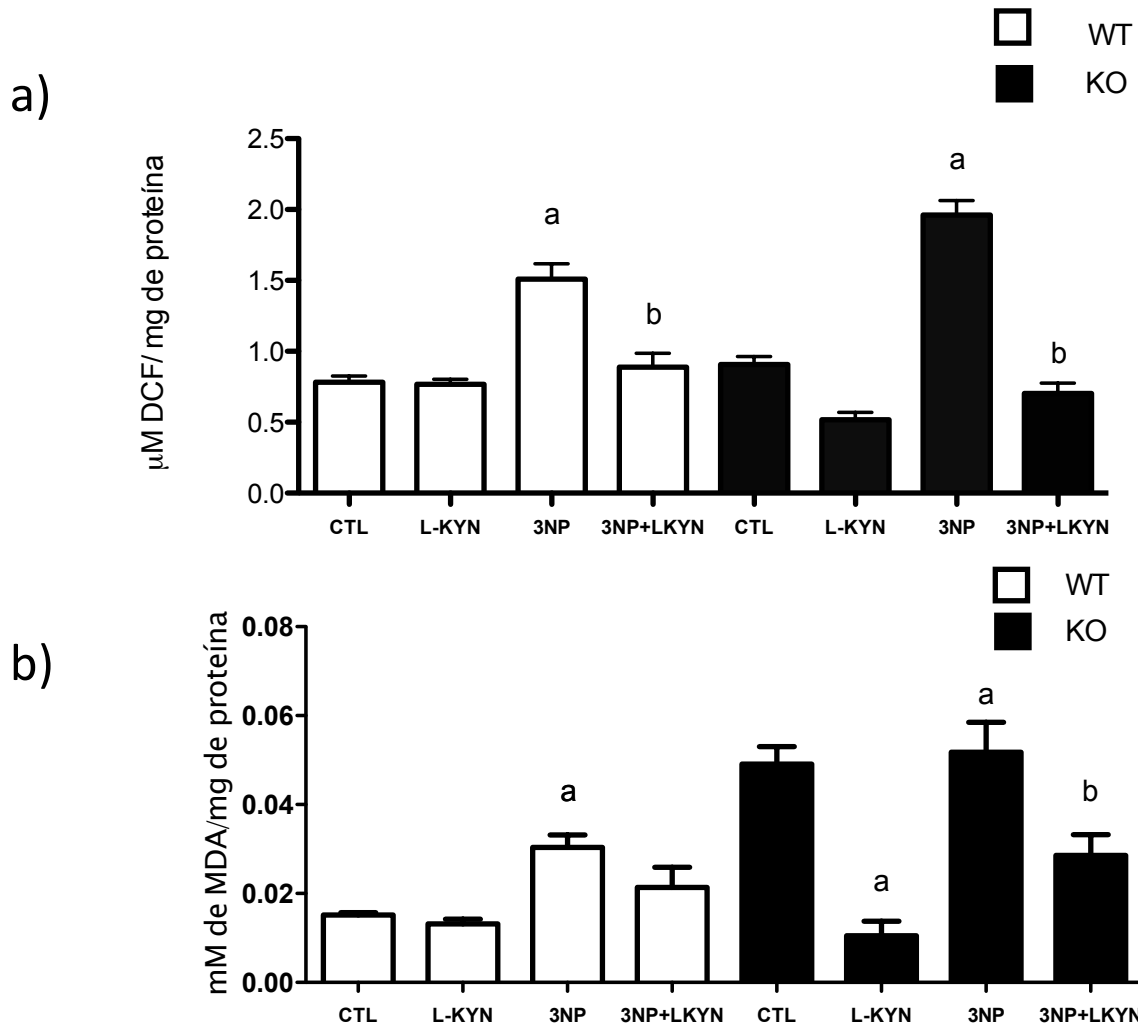


Fig. 13 Efecto del 3-NP y L-KYN en el hipocampo de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad sobre la formación de especies reactivas del oxígeno (a) y la peroxidación de lípidos (b). Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, n=6. ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. ^a $p < 0.05$ vs control, ^b $p < 0.05$ vs 3NP

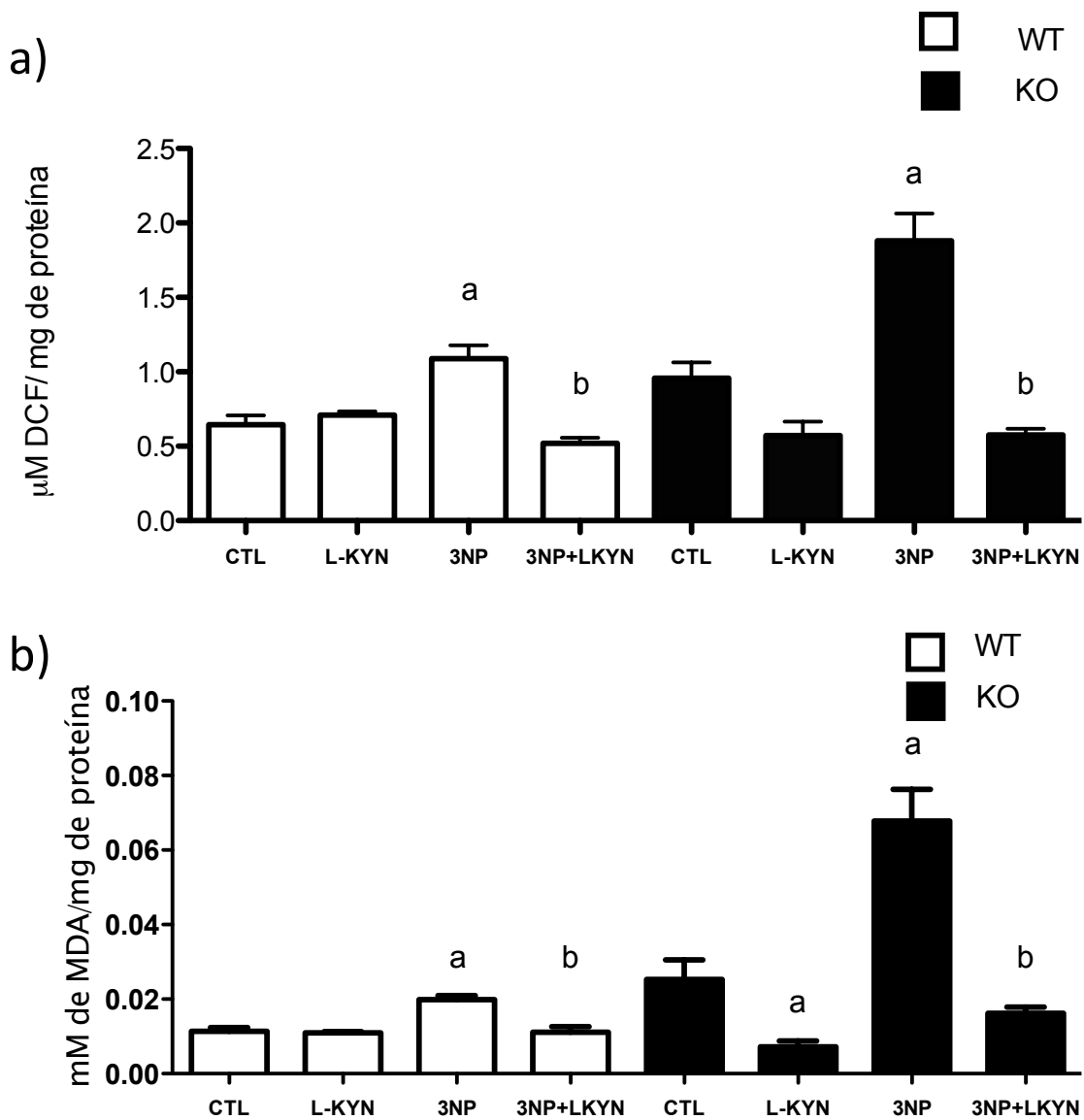


Fig. 14 Efecto del 3-NP y L-KYN en el estriado de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad sobre la formación de especies reactivas del oxígeno (a) y la peroxidación de lípidos (b). Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, n=6. ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. ^a $p < 0.05$ vs control, ^b $p < 0.05$ vs 3NP

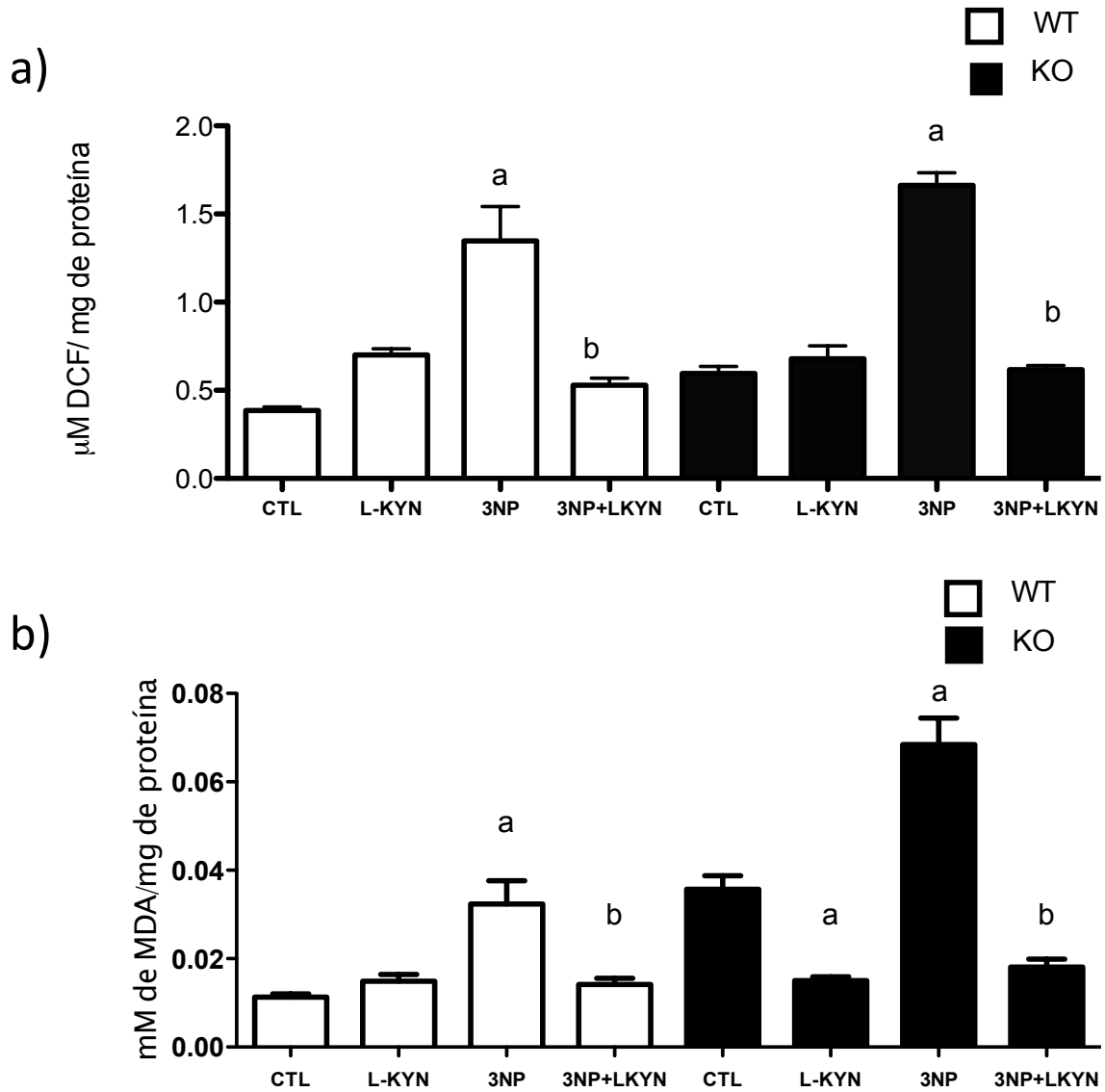


Fig. 15 Efecto del 3-NP y L-KYN en la corteza de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad sobre la formación de especies reactivas del oxígeno (a) y la peroxidación de lípidos (b). Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, n=6. ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. ^a p < 0.05 vs control, ^b p < 0.05 vs 3NP

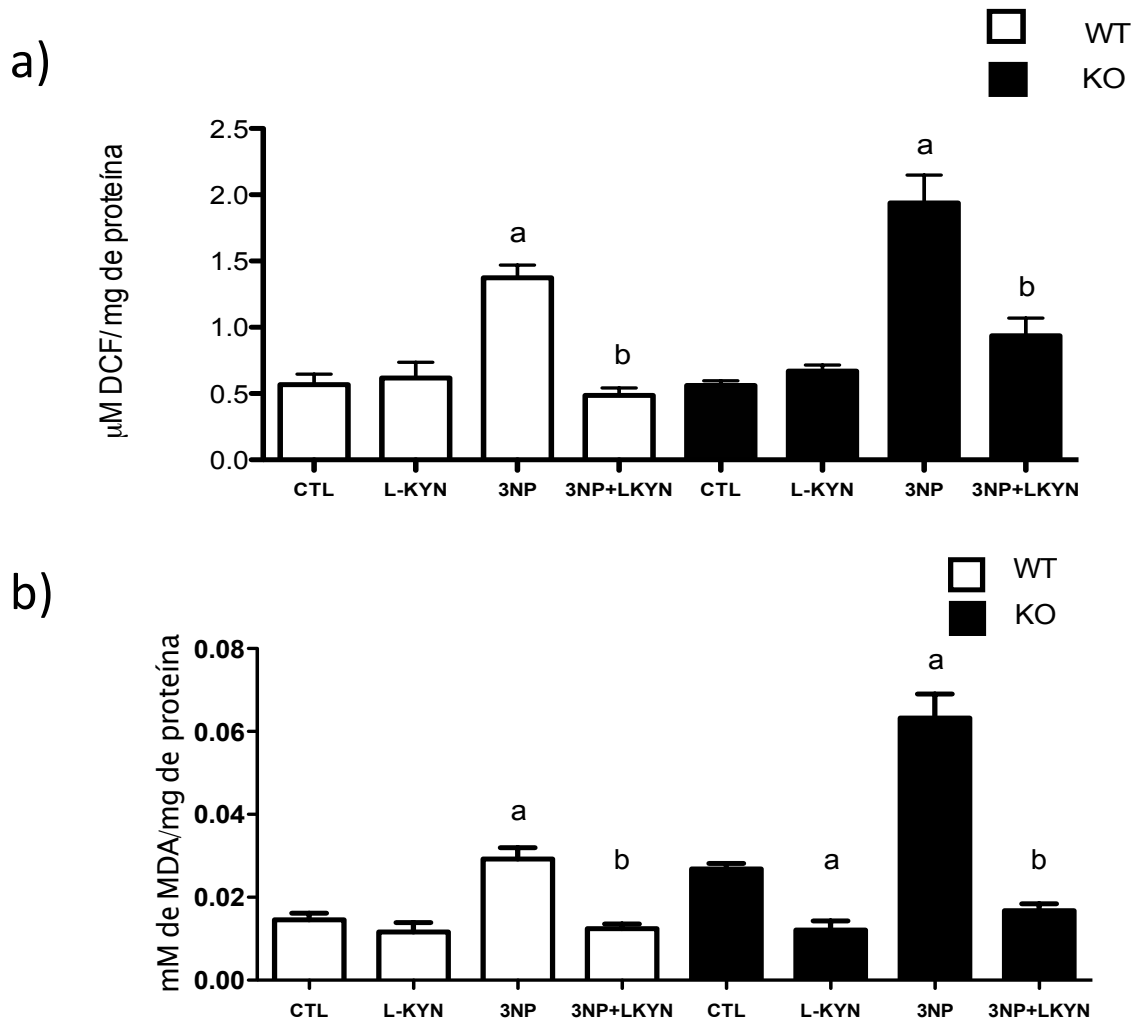


Fig. 16 Efecto del 3-NP y L-KYN en el cerebelo de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad sobre la formación de especies reactivas del oxígeno (a) y la peroxidación de lípidos (b). Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, $n=6$. ^a $p < 0.05$ vs control, ^b $p < 0.05$ vs 3NP. Se utilizó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey.

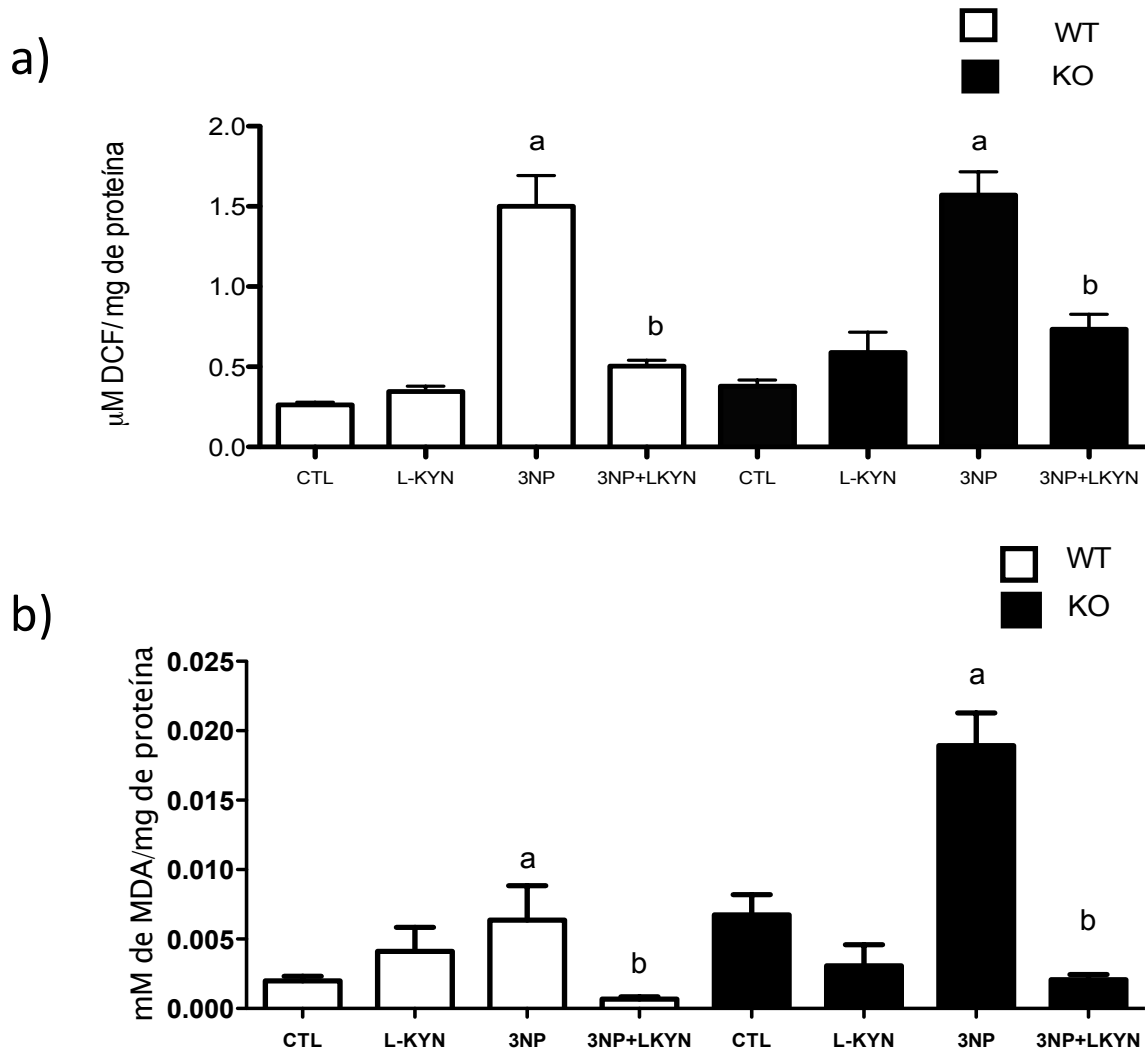


Fig. 17 Efecto del 3-NP y L-KYN en el hígado de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad sobre la formación de especies reactivas del oxígeno (a) y la peroxidación de lípidos (b). Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, n=6. ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. ^a p < 0.05 vs control, ^b p < 0.05 vs 3NP

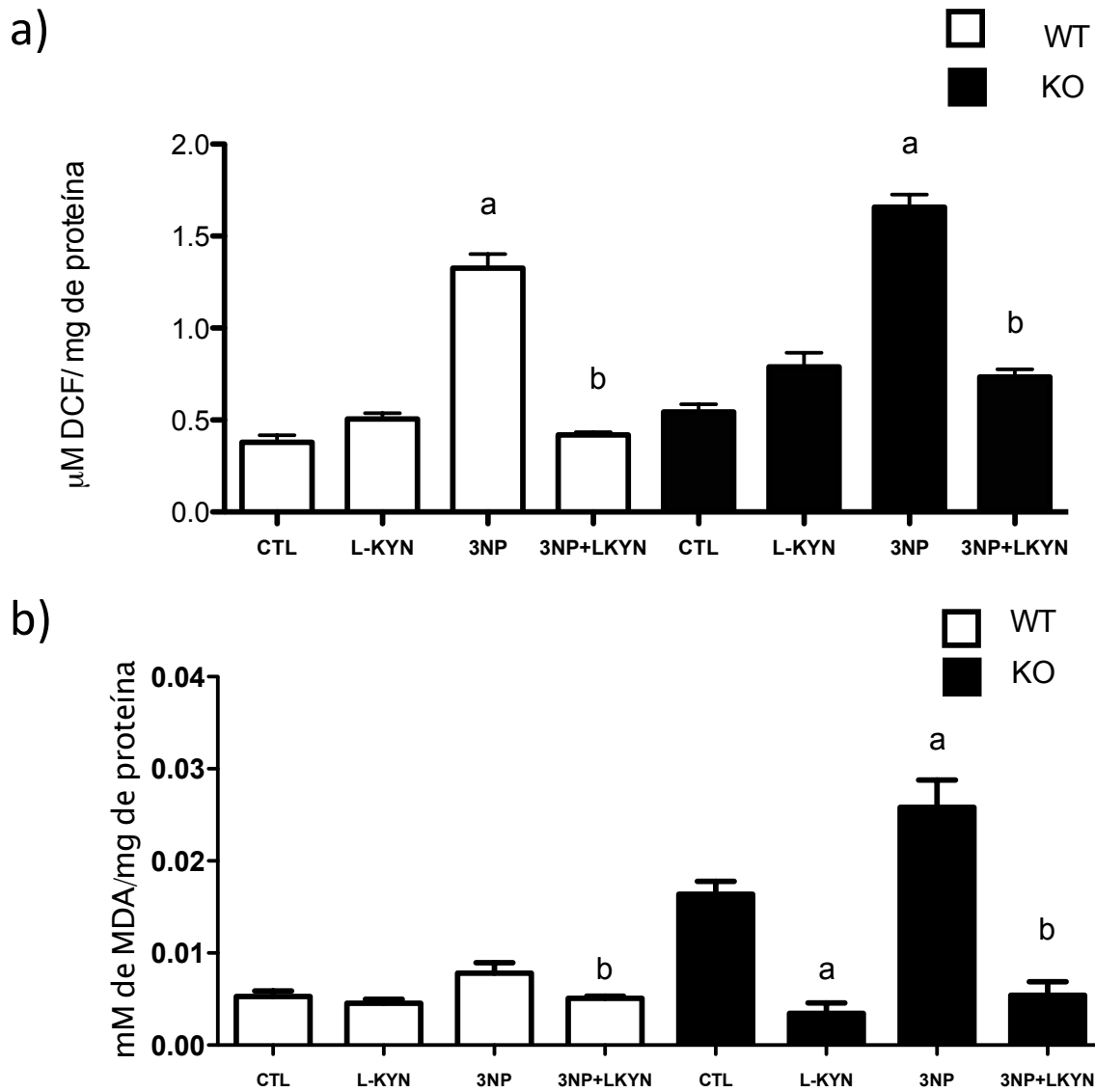


Fig. 18 Efecto del 3-NP y L-KYN en el riñón de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad sobre la formación de especies reactivas del oxígeno (a) y la peroxidación de lípidos (b). Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, n=6. ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. ^a $p < 0.05$ vs control, ^b $p < 0.05$ vs 3NP

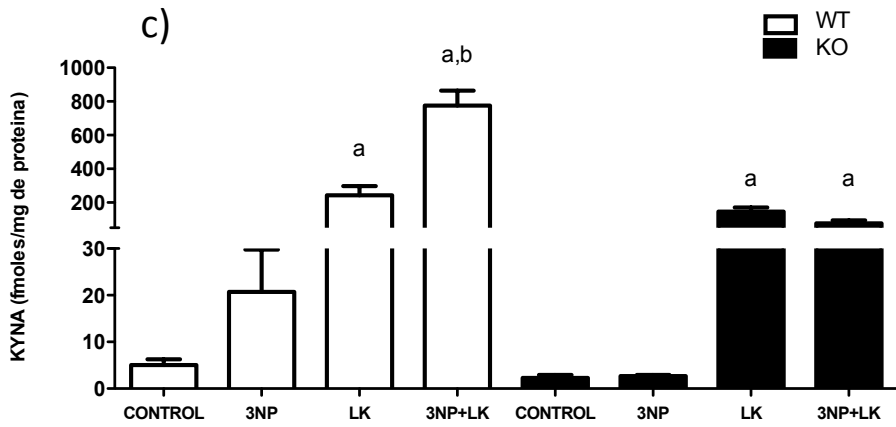
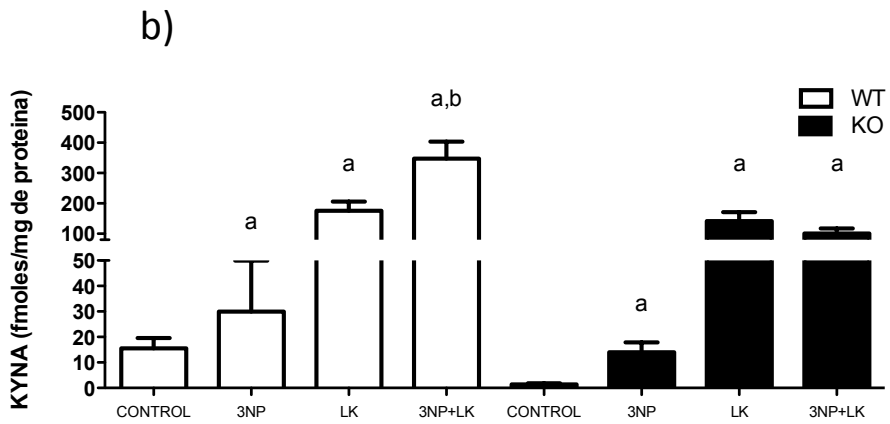
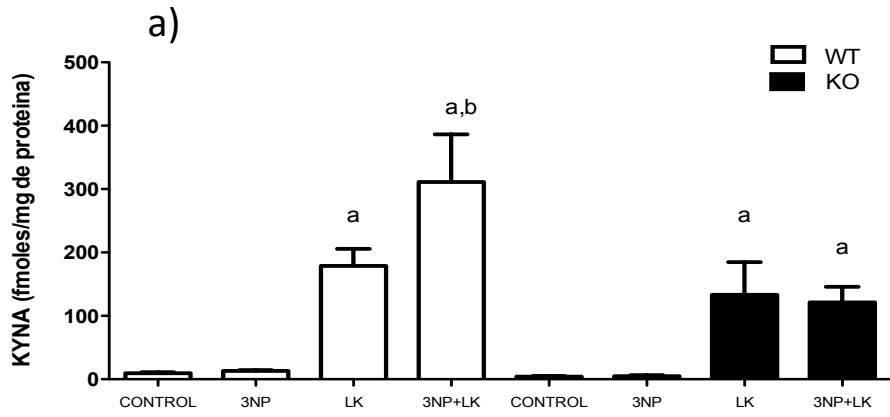
6.1.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE L-KYN Y 3NP EN LA FORMACIÓN DE KYNA

La administración intraperitoneal de L-KYN indujo un aumento en los niveles de KYNA en los ratones WT al igual que en los ratones *KO KATII*, este aumento mostró diferencias significativas con respecto al control en ambos genotipos, y dicho efecto se observó en todas las regiones evaluadas excepto en el hígado de los ratones WT en el que este incremento en los niveles de KYNA no fue significativo.

Por otro lado la administración intraperitoneal de 3-NP no mostró cambios significativos en los niveles de KYNA con respecto al control tanto en los ratones WT como los *KO KATII*. Solo en el caso del estriado la administración de 3-NP trajo consigo un aumento significativo en la formación de KYNA. Cuando se administró conjuntamente el 3NP con L-KYN en los ratones WT se observó un aumento en la formación de KYNA, dicho aumento fue significativamente más alto que el ocasionado solo por la L-KYN en el hipocampo, estriado y corteza de estos ratones. En el caso de los ratones *KO KATII*, la administración de L-KYN en conjunto con 3NP no mostró cambios significativos con respecto a la sola administración de L-KYN.

Para ambos ratones la administración de L-KYN aumenta la formación de KYNA, en los ratones WT esto debe ser en gran parte por la actividad de la enzima kinurenina aminotransferasa II que cataliza la formación de L-KYN a KYNA, sin embargo en los ratones *KO KATII* esta formación a partir de la L-KYN debe ser por otro mecanismos de formación que sea independiente de dicha enzima.

En base a estos resultados podemos decir que la administración de 3NP junto con L-KYN indujo a un aumento en la formación de KYNA con respecto a los animales que fueron administrado únicamente con L-KYN sin embargo este efecto solo se vio en algunas regiones en los ratones WT. En los ratones *KO KATII* no hubo diferencias significativas entre los animales que fueron administrados únicamente con L-KYN y los que en conjunto fueron inyectados con 3NP.



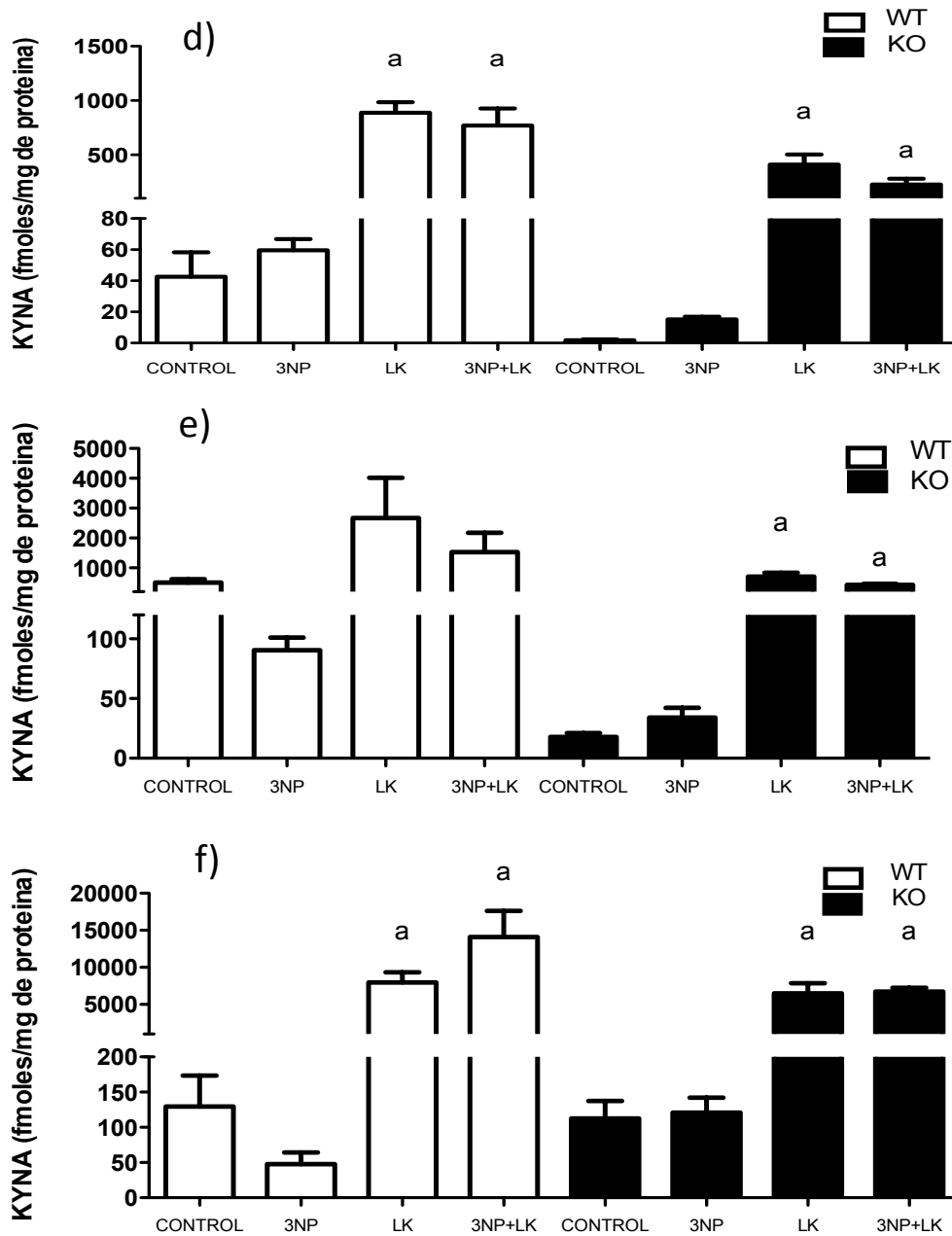


Fig. 19 Efecto del 3-NP y L-KYN en la formación de KYN en hipocampo (a), estriado (b), corteza (c), cerebelo (d), hígado (e) y riñón (f) de ratones *KO KAT11* y WT de 28 días de edad. Los valores están expresados en promedios \pm E.S.M, n=6. ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. ^a $p < 0.05$ vs control, ^b $p < 0.05$ vs 3NP

Tabla. 2 Relación de los niveles de Acido Kinurénico (KYNA), glutatión reducido(GSH), especies reactivas del oxígeno (ERO), Peroxidación de lípidos (PL), así como actividad de la glutatión reductasa (GR) , glutatión peroxidasa (GPx) y de la superoxido dismutasa (SOD) en los ratones KO KATII comparado con los ratones WT de 28 días de edad.

	ERO	PL	SOD	GPx	GR	GSH	KYNA
HIPOCAMPO	↑	↑	↓	↓	↓	=	↓
ESTRIADO	↑	↑	↓	↑	=	=	↓
CORTEZA	↑	↑	=	↓	=	↑	↓
CEREBELO	=	↑	=	↑	=	↑	↓
HIGADO	↑	↑	=	=	=	↑	↓
RIÑON	↑	↑	↑	=	=	↓	=

↑ Aumenta
 = Igual
 ↓ Disminuye

7. DISCUSION

En los ratones *KO KATII* los niveles de KYNA van aumentando conforme aumenta la edad de los ratones, hasta alcanzar los niveles de KYNA normales, excepto en el hígado en el que los niveles de KYNA se mantienen disminuidos esto concuerda con lo reportado previamente por Ping Yu en el 2004. Sin embargo pareciera que la delección del gen para la *KATII* no altera los niveles de KYNA en el riñón, lo que sugiere que la formación de KYNA en el riñón es independiente de la *KATII* y que probablemente involucre otras isoformas de esta enzima posiblemente a la *KAT I* ya que esta se encuentra principalmente expresada en hígado y riñón de humanos y ratas (Rossi F. et al. 2008) o bien algún otro mecanismo aun no reportado.

Por otra parte, al caracterizar el perfil antioxidante de estos ratones podemos decir que en primer lugar los niveles basales de ERO y PL están incrementados en los ratones *KO KATII* con respecto a los WT. Aunque no se observa un patrón definido con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes, no significa que la expresión de las enzimas no este alterada, ya que en este trabajo este parámetro no fue evaluado, por lo que sería pertinente evaluarlo para tener una visión mas clara de las alteraciones antioxidantes que puedan presentar estos ratones.

Sin embargo podemos observar una tendencia clara en el hipocampo ya que en esta región hay un aumento de ERO de manera basal en estos animales acompañado de una disminución en la actividad de la glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. Esto podría sugerir que la deficiencia de KYNA podría estar implicada en estas alteraciones, debido a que en estudios previos se ha visto el impacto que tiene la deficiencia de KYNA en el hipocampo de estos ratones, ya que se ha reportado que la neurotransmisión gabaérgica se encuentra incrementada en las neuronas piramidales del hipocampo en los ratones *KO KATII* a los 21 días de edad y que esto está relacionado con la alta actividad de los receptores $\alpha 7$ -nicotínicos ocasionada por los bajos niveles de KYNA. Además la sobreactividad de estos receptores ocasionó que los ratones *KO KATII*

presenten un aumento en la actividad locomotora, lo cual dejó en claro la importancia de KYNA como regulador de los receptores $\alpha 7$ -nicotínicos y de la actividad en los axones GABAérgicos, sugiriendo entonces que puede ser un regulador indirecto de la excitabilidad de las neuronas piramidales del hipocampo (M. Alkandon et al. 2004). Además este mismo grupo reportó que la deficiencia de KYNA en estos ratones, ocasionó una disminución en la densidad dendrítica en neuronas del hipocampo, resaltando la importancia de KYNA en el hipocampo de estos ratones.

En estos ratones la deficiencia de KYNA podría representar una susceptibilidad ante la producción de especies reactivas del oxígeno ya sea directamente por su efecto antioxidante indirectamente por el papel antagónico que juega sobre ciertos receptores para neurotransmisores entre ellos los de tipo NMDA que son los principales involucrados en procesos de excitotoxicidad.

Sin embargo los niveles de glutatión reducido fueron mayores en la corteza, cerebelo e hígado de los ratones KO *KATII* comparados con los valores obtenidos en los ratones WT esto podría deberse a una mayor actividad de la enzima γ -glutamyl-cisteina sintetasa y de la glutatión sintetasa que son las enzimas encargadas de sintetizar en el citoplasma el glutatión reducido (GSH), utilizando glutamato, glicina y cisteína como sustrato para formar el tripéptido (Ballatori N. et al. 2009).

En base a estos resultados podemos decir que la administración de 3-NP en ambos ratones indujo un aumento en la formación de ERO y en la PL, y que dicho efecto fue región dependiente, mientras que la administración conjunta de esta toxina con la L-KYN trajo consigo una disminución en la formación de ERO.

En ambos genotipos de ratones la administración de L-KYN aumenta la formación de KYNA, en los ratones WT como ya sabemos esto se debe en gran parte a la actividad de la enzima kinurenina aminotransferasa II (*KAT II*) que cataliza la formación de L-KYN a KYNA, sin embargo en los ratones *KO KATII* este incremento en la formación de KYNA a partir de la L-KYN se debe a otros mecanismos de formación por una vía alternativa independiente a dicha enzima, que podría ser una sobre actividad de la *KAT I* o la *KAT III*.

En base a estos resultados podemos decir en el hipocampo, estriado y corteza de los ratones WT, la administración de 3-NP junto con L-KYN, indujo a un aumento en la formación de KYNA con respecto a los animales que fueron administrados únicamente con L-KYN esto sugiere que efectivamente como se había reportado anteriormente la L-KYN es capaz de interactuar con las ERO para formar KYNA.

Sin embargo en los ratones *KO KATII* no hubo diferencias significativas en la producción de KYNA animales que fueron administrados únicamente con L-KYN y los que en conjunto fueron inyectados con 3-NP, tal vez esto se deba a que si los ratones *KO KATII* presentan una mayor cantidad de ERO, el KYNA que se este formando también podría inmediatamente interactuar con estas ERO, ejerciendo su efecto antioxidante como lo reporto Lugo et al. en el 2011, esto con el fin de disminuir este daño oxidativo ocasionado por el 3-NP.

Mientras que la simple administración de 3-NP indujo un aumento en la formación de KYNA en el estriado de ambos genotipos de ratones, se ha visto que toxinas como el 3-NP son capaces de activar los receptores para glutamato de tipo NMDA lo que lleva a la generación de eventos citotóxicos. Sin embargo se ha observado que cuando esto sucede el KYNA es incapaz de ejercer su papel antagónico sobre estos receptores, es decir KYNA no podría ejercer dicho efecto neuroprotector. Sin embargo este aumento en estos niveles de KYNA ocasionado por la administración de 3-NP podría deberse a dicho efecto excitotóxico ya que al haber una mayor formación de especies reactivas del oxígeno estas podrían interactuar con la L-KYN para formar KYNA.

En base a estos resultados se ha demostrado que la interacción de la L-KYN y las ERO llevan a la formación de KYNA (figura 20), lo cual es comprobado en el hipocampo estriado y corteza de los ratones WT. 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 establecemos que la interacción de L-KYN con especies reactivas tiene efecto sobre los niveles de KYNA.

Dado que en este trabajo observamos que bajo un insulto oxidante, se puede generar una mayor cantidad de KYNA, sería de gran importancia estudiar los procesos que pudieran estar involucrados en esta formación de KYNA en el cerebro y plantear preguntas como si ¿El KYNA producido a partir de la interacción entre las ERO y la L- 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 probando si dicho efecto se observa en diferentes modelos de estrés oxidante.

8. CONCLUSIONES

Los ratones KO presentaron alteraciones en la actividad de las tres enzimas antioxidantes que se evaluaron (SOD, GPx y GR) sin embargo no hay un patrón en particular. Cabe resaltar que en el hipocampo de estos ratones se observa una tendencia a la disminución en la actividad de estas enzimas antioxidantes y esto pareciera estar relacionado con la disminución de KYNA. En los ratones KO hay una mayor cantidad de glutatión reducido (GSH) lo cual podría deberse a una mayor actividad de la γ -glutamyl-cisteína sintetasa y de la glutatión sintetasa en estos ratones.

La administración de L-KYN aumenta los niveles de KYNA en ambos genotipos de ratones. Mientras que la administración de L-KYN en conjunto con 3-NP indujo un aumento en la formación de KYNA solo en la corteza, hipocampo y estriado de los ratones WT lo que demuestra la formación de KYNA a partir de la interacción de la L-KYN con las especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, no se observó este mismo efecto en los ratones *KO KATII* en ninguna de las regiones estudiadas.

Además la administración de 3-NP indujo un aumento en la formación de ERO y la PL en ambos genotipos de ratones y la L-KYN fue capaz de disminuir el daño evocado por esta toxina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aikens, J., & Dix, T. A. (1991). Perohydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 266(23), 15091-15098.
2. Ali, S. F., C. P. LeBel and S. C. Bondy (1992). "Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity." *Neurotoxicology* 13(3): 637-648.
3. Alexi T, Hughes PE, Knüsel B, Tobin AJ. (1998). Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague-Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp Neurol.*,153(1):74-93.
4. Alkondon M, Pereira EF, Yu P, Arruda EZ, Almeida LE, Guidetti P, Fawcett WP, Sapko MT, Randall WR, Schwarcz R, Tagle DA, Albuquerque EX. 2004. Targeted deletion of the kynurenine aminotransferase ii gene reveals a critical role of endogenous kynurenic acid in the regulation of synaptic transmission via alpha7 nicotinic receptors in the hippocampus. *J Neurosci*. 24: 4635-4648.
5. Andersen PM, Nilsson P, Keränen ML, Forsgren L, Hägglund J, Karlsborg M, Ronnevi LO, Gredal O, Marklund SL. (1997). Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain*. :1723-37.
6. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009) Glutathione dys regulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214.
7. Baran, H. J., K. Deecke, L. . (1999). Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 106, 165-161-181.
8. Beadle GW, Mitchell HK, Nyc JF. 1947. Kynurenine as an Intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophane by neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA* 33:155-8.
9. Beal MF. (1994) Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease., *Curr Opin Neurol.*,7(6):542-7.

10. Bender DA., McCreanor GM., 1982. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *Biochim Biophys Acta* 717:56-60.
11. Carpenedo, 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.
12. 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
13. Choe M, Jackson C, Yu BP. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med* 18:977-984.
14. Choi JH, YU BP. 1995. Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med* 18:133-139.
15. Coles CJ., Edmonson DE., Singer TP. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 254:5161-5167.
16. Csillik A¹, Knyihár E, Okuno E, Krisztin-Péva B, Csillik B, Vécsei L. (2002). Effect of 3-nitropropionic acid on kynurenine aminotransferase in the rat brain. *Exp Neurol.*,177(1):233-41.
17. Ellinger, A. (1904). Die entstehung der Kynurenäure. *Z Physiol Chem*, 43, 325-337.
18. Fatokun AA¹, Smith RA, Stone TW. (2008). Resistance to kynurenic acid of the NMDA receptor-dependent toxicity of 3nitropropionic acid and cyanide in cerebellar granule neurons. *Brain Res*. 18;1215:200-7.
19. Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. 1991. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56:2007-17.
20. Fukushima T, Sone Y, Mitsuhashi S, Tomiya M, Toyo'oka T. 2008. Alteration of kynurenic acid concentration in rat plasma following optically pure kynurenine administration: a comparative study between enantiomers. *Chirality*. 21: 468-472.
21. González-Reyes S, Guzmán-Beltrán S, Medina-Campos, Pedraza-Chaverri J.(2013). Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents

hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxid Med Cell Longev.*;801418.

22. Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. 1997. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res.* 50: 457–465.
23. Guidetti P., Eastman CL., Schwarcz R. 1995. Metabolism of [5-3H]kynurenine in the rat brain in vivo: evidence for the existence of a functional kynurenine pathway. *J Neurochem* 65:2621-2632.
24. 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
25. Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati Pj, Croitoru J, Brew BJ. 2001. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78: 842-853.
26. Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.
27. Halliwell B, Gutteridge, J.M., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford Sciences Publication, Oxford, USA, 617–783.
28. Hardeland R, Poeggeler B, Mueller U., Zsizsik BK, Burkhardt S, Fuhrberg B, Holst S, Behrmann G. 2001. Melatonin and other tryptophan metabolites in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*: Rhythms, catabolism and the fate of products. VI Latin Am Symp Chronobiol, Natal p.23.
29. 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.
30. Hayaishi O. 1976. Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biochem* 79: 13-21.
31. Hayaishi O., Rothberg, S., Mehler AH., Saito Y. 1957. Studies on oxygenases; enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J Biol Chem* 229: 889-896.

32. Herrera-Mundo, N. and M. Sitges (2010). "Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid." *J Neurochem* 114(2): 597-605.
33. 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.
34. 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.
35. Hirata F, Hayaishi O. 1971. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 246:7825-7826
36. Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18:27-79.
37. Kehrer JP. 2000. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62:235-6.
38. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 106: 289–295.
39. 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
40. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature.*, 5;364(6437):535-7.
41. Liebig, J. (1853). Über kynurensäure. Justus Liebig's. *Ann Chem*, 86, 125-126.
42. Lindahl T, Wood RD. 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286: 1897- 1905.
43. Luchowski P¹, Luchowska E, Turski WA, Urbanska EM. (2002). 1-Methyl-4-phenylpyridinium and 3-nitropropionic acid diminish cortical synthesis of kynurenic

- acid via interference with kynurenine aminotransferases in rats. *Neurosci Lett.*, 13;330(1):49-52.
44. Ludolph AC., He F., Spencer PS., Hammerstad J., Sabri M. 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18:492-498.
45. Lugo- Huitrón. 2014. Nueva ruta de formación de ácido kinurénico a partir de kinurenina y especies reactivas del oxígeno. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM
46. Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverrí J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzón E, Ortiz-Islas E, López T, García E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaría A, Pérez-De La Cruz. 2011. On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol.* 33: 5335-5347.
47. Lugo-Huitrón R, Ugalde Muñiz P, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-de la Cruz V.(2013). Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev.*, 2013:104024.
48. Miranda AF, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. 1997. Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. *Neuroscience* 78(4):967-75.
49. Moroni L, Russi P, Carla V, Lombardi G. 1988. Kynurenic acid is present in the rat brain and its content increases during development and aging processes. *Neurosci Lett* 94: 145-150.
50. Moroni, F. (1999). Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharmacol*, 375(1-3), 87-100.
51. *Neurosci Res.* (2006). S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res*, 56(1):39-44..
52. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato E. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr.* 53:2015-2055.

53. 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.
54. Okamoto H., Yamamoto S., Nozaki M., Hayaishi O. 1967. On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 26: 309-314.
55. Okuno E, Schmidt W, Parks DA, Nakamura M, Schwarcz R. 1991. Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations. *J Neurochem*. 1991;57:533-40.
56. Okuno E., Kido R., 1991. Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol* 294:167-176.
57. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest.*,75(5):617-36.
58. Paglia DE, Valentine WN. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.*;70(1):158-69.
59. 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.
60. Pérez-de la Cruz V, Amori L, Sathyaikumar KV, Wang XD, Notarangelo FM, Wu HQ, Schwarcz R. 2011. Enzymatic transamination of d-kynurenine generates kynurenic acid in rat and human brain. *J. Neurochem*.
61. Perez-De La Cruz, V., D. Elinos-Calderon, P. Carrillo-Mora, D. Silva-Adaya, M. Konigsberg, J. Moran, S. F. Ali, M. E. Chanez-Cardenas, G. Perez-De La Cruz and A. Santamaria (2010). "Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: modulation by proteases inhibition." *Neurochem Int* 56(6-7): 834-842.
62. Ping Yu, Di Prospero NA, Sapko MT, Cai T, Chen A, Melendez-Ferro M, Du F, Whetsell WO Jr, Guidetti P, Schwarcz R, Tagle DA. 2004. Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 24: 6919-6930.

63. 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.
64. 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
65. Robert Schwarcz, John P. Bruno, Paul J. Muchowski, and Hui-Qiu Wu. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci.*,*13*(7): 465–477.
66. Rossi F, Schwarcz R, Rizzi M. (2008). Curiosity to kill the KAT (kynurenine aminotransferase): structural insights into brain kynurenic acid synthesis. *Curr Opin Struct Biol.*,*18*(6):748-55.
67. 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
68. Schaich KH. 1992. Metals and lipid oxidation. *Lipids* 27:209-218.
69. Schmidt W, Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. 1993. Characterization of human brain kynurenine aminotransferases using 3H-kynurenine as a substrate. *Neuroscience*. 1993 Jul;*55*(1):177-84.
70. 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.
71. Selva Rivas-Arancibia, Cesar Gallegos-Ríos, Nancy Gomez-Crisostomo, Ever Ferreira-Garcidueñas, Dulce Flores Briseño, Luz Navarro and Erika Rodríguez-Martínez.(2011). "Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring", Chapter 3, ISBN 978-953-307-485-6.
72. Silva-Adaya D., Pérez-De La Cruz V., Villeda-Hernández J., Carrillo-Mora P., González-Herrera IG., García E., Colín-Barengue L., Pedraza-Chaverrí J., Santamaría A. 2011. Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurate as protective strategy. *Neurotoxicol Teratol* 33:303-312.
73. Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*. 45:309-379.

74. Thomas SR, Mohr D, Stocker R. 1994. Nitric oxide inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 269: 14457-14464.
75. Túnez I., Montilla P., Muñoz MC., Drucker-Colín R. 2004. Effect of nicotine on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 504:169-175.
76. 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
77. Vender AD. 1975. The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. In John Wiley and Sons (Eds.), *Aminoacid metabolism*, John Wiley and Sons, USA pp 172-177.
78. Wüllner U, Young AB, Penney JB, Beal MF. (1994). 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J Neurochem.*, 63(5):1772-81
79. 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
80. Zentella M, Saldaña Y. 1996. Papel Fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioquímica.* 15:152-161.
81. 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.
82. 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.
83. 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.