



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL FIERRO, COBRE Y PLOMO EN LA PRODUCCION DE LOS
METABOLITOS DE LA VIA DE LA KINURENINA EN ASTROCITOS
PRIMARIOS DE RATA Y REBANADAS CEREBRALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
DANIELA RAMIREZ ORTEGA

DRA. VERONICA PEREZ DE LA CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA

DRA. HERMINA PASANTES ORDOÑEZ
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

DR. IVAN VELASCO VELAZQUEZ
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

Ciudad de México, febrero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Me enseñaron que el camino del
progreso no es ni rápido ni fácil.*

Marie Curie

*Si no puedes volar entonces corre,
si no puedes correr entonces camina,
si no puedes caminar entonces arrástrate,
pero sea lo que hagas,
sigue moviéndote hacia delante.*

Martin Luther King

*El hombre al que le preocupa gastar
una hora de su tiempo, aún no ha
descubierto el valor de la vida.*

Charles Darwin

Agradecimientos

- A la Dra. Verónica Pérez de la Cruz por la dirección en este trabajo, consejos, confianza pero sobre todo por compartir su conocimiento y hacer que el desarrollo de esto fuera más fructífero de lo que esperaba.
- A la Dra. Dinora González por su ayuda por los consejos para el desarrollo de procedimientos de este trabajo.
- Al Dr. Benjamin Pineda por ampliar la visión que tenía de este trabajo y sus comentarios.
- A mi comité de maestría por sus comentarios acertados.
- A los Doctores que formaron parte del sínodo por la atención y el tiempo brindado.
- Al apoyo recibido por CONACyT.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Efecto del hierro, cobre y plomo en la producción de los metabolitos de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata y rebanadas cerebrales

Índice

Contenido

| | |
|---|--------|
| Agradecimientos..... | - 3 - |
| Índice..... | - 4 - |
| Abreviaturas | - 6 - |
| INTRODUCCIÓN | - 10 - |
| Generalidades de los metales..... | - 10 - |
| Hierro | - 10 - |
| Cobre | - 12 - |
| Plomo | - 13 - |
| Estrés oxidante | - 15 - |
| La vía de la kinureninas | - 16 - |
| Enzimas de la vía de la kinurenina | - 19 - |
| Justificación | - 21 - |
| Hipótesis..... | - 21 - |
| Objetivo general | - 21 - |
| Objetivos particulares | - 21 - |
| Métodos | - 22 - |
| Reactivos | - 22 - |
| Animales..... | - 22 - |
| Cultivo de astrocitos primarios..... | - 22 - |
| Preparación de rebanadas..... | - 23 - |
| Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO) | - 23 - |
| Determinación de peroxidación de lípidos (PL)..... | - 23 - |
| Estimación de la viabilidad celular | - 23 - |
| Actividad de lactato deshidrogenasa | - 24 - |

| | |
|--|--------|
| Cuantificación de proteína por Lowry | - 24 - |
| Determinación del potencial de membrana mitocondrial por JC-1..... | - 24 - |
| Ioduro de propidio | - 24 - |
| Evaluación de la actividad de IDO | - 25 - |
| Evaluación de la actividad de las KAT's | - 25 - |
| Evaluación de la actividad de la KMO | - 25 - |
| Estadística..... | - 26 - |
| RESULTADOS..... | - 27 - |
| EFECTO DEL PLOMO | - 27 - |
| Efecto del PbAc en rebanadas corticales de rata | - 27 - |
| Efecto del PbAc en la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina en rebanadas de corteza de rata | - 28 - |
| Efecto del PbAc en astrocitos primarios de rata | - 29 - |
| Efecto del PbAc en la actividad de las enzimas de la VK en astrocitos primarios de rata | - 30 - |
| Efecto de la co-incubación de PbAc con metabolitos de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata..... | - 31 - |
| EFECTO DEL COBRE | - 32 - |
| Efecto de CuSO ₄ en rebanadas corticales de rata | - 32 - |
| Efecto del CuSO ₄ en la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina en rebanadas cerebrales de rata | - 33 - |
| Efecto de la co-incubación de los metabolitos de la vía de la kinurenina con CuSO ₄ en rebanadas de corteza de rata | - 35 - |
| Efecto del CuSO ₄ en astrocitos primarios de rata | - 36 - |
| Efecto del CuSO ₄ en la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata..... | - 37 - |
| Efecto de la co-incubación de CuSO ₄ con metabolitos de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata..... | - 37 - |
| DISCUSION..... | - 39 - |
| CONCLUSIONES..... | - 40 - |
| PERSPECTIVAS..... | - 41 - |
| BIBLIOGRAFÍA | - 42 - |
| PUBLICACIONES | - 49 - |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------------|---|
| • 3-HK | 3-hidroxikinurenina |
| • AA | Ácido antranílico |
| • BSA | Albúmina de suero bovino |
| • Ca ²⁺ | Calcio |
| • CaCl ₂ | Cloruro de calcio |
| • CO | Monóxido de carbono |
| • Cu (I), (II) | Cobre |
| • Cu(NO ₃) ₂ | Nitrato de cobre |
| • DCF-DA | 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato |
| • DFO | Deferoxamina mesilato |
| • DCF | Dicloro-fluoresceína |
| • DCT1 | Transportador divalente de moléculas catiónicas 1 |
| • DMEM | Medio Dulbecco modificado |
| • DMT1 | Transportador de metales divalente 1 |
| • DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| • EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| • EA | Enfermedad de Alzheimer |
| • EAL | Esclerosis amiotrófica lateral |
| • EH | Enfermedad de Huntington |
| • EP | Enfermedad de Parkinson |
| • ERO | Especies reactivas del oxígeno |
| • ERN | Especies reactivas del nitrógeno |
| • Fe ²⁺ , Fe | Fierro |
| • FeSO ₄ | Sulfato ferroso |
| • GPx | Glutación peroxidasa |

| | |
|---|---|
| • H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| • HANA | Ácido 3-hidroxi-antranílico |
| • HCl | Ácido clorhídrico |
| • HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| • H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| • IDO | Indolamina 2,3-dioxigenasa |
| • KAT | Kinurenina amino transferasa |
| • KCl | Cloruro de potasio |
| • KMO | Kinurenina 3-monooxigenasa |
| • KNO ₂ | Nitrito de potasio |
| • KYNA | Ácido kinurénico |
| • LDH | Lactato deshidrogenasa |
| • L-kyn | L-kinurenina |
| • MAP | Cinasas activadas por mitógeno |
| • Mg ²⁺ | Magnesio |
| • MgSO ₄ | Sulfato de magnesio |
| • MnO ₂ | Óxido de manganeso |
| • MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo |
| • Na ₂ HPO ₄ | Fosfato dibásico de sodio |
| • NaCl | Cloruro de sodio |
| • NAD ⁺ | Nicotin adenin dinucleótido |
| • NADPH | Nicotin adenin dinucleótido fosfato |
| • NaH ₂ PO ₄ | Fosfato monobásico de sodio |
| • (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ | Sulfato ferroso amoniacal |
| • NaOH | Hidróxido de sodio |

| | |
|---------------------------|---|
| • NBT | Nitroazul de tetrazolio |
| • NCAM | Moléculas de adhesión de células neuronales |
| • NMDA | N-metil-D-aspartato |
| • $^1\text{O}_2$ | Singulete de oxígeno |
| • O_2 | Oxígeno |
| • $\text{O}_2^{\bullet-}$ | Anión superóxido |
| • $\bullet\text{OH}$ | Radical hidroxilo |
| • ONOO^- | Peroxinitrito |
| • PbAc | Acetato de plomo |
| • PBS | Buffer de fosfatos |
| • PI | Ioduro de propidio |
| • PL | Peroxidación de lípidos |
| • PMS | Metosulfato de fenazina |
| • QUIN | Ácido quinolínico |
| • SDS | Dodecilsulfato sódico |
| • S.E.M. | Error estándar de la media |
| • SNC | Sistema Nervioso Central |
| • SOD | Superóxido dismutasa |
| • TAE | Tris-acético-EDTA |
| • TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| • TBA-RS | Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico |
| • TCA | Ácido tricloroacético |
| • TDO | Triptófano-2,3-dioxigenasa |
| • Tris | Hidroximetil-aminometano |
| • VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |

- VK
- Zn²⁺

Vía de la Kinurenina

Zinc

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los metales

Los metales forman parte de las familias I A (alcalinos), II A (alcanotérreos), IIIA y IV (metales del bloque p) y I-B a VIII-B los metales de transición. Los metales tienen un papel muy importante en los sistemas vivos realizando diversas funciones como estabilizadores de estructuras biológicas y por ende como parte estructural (por ejemplo, hemoglobina), activadores enzimáticos, componentes de sistemas redox (por ejemplo la superóxido dismutasa) y además son capaces de intervenir en procesos del metabolismo celular. El balance de estos metales dentro del sistema biológico es muy importante, ya que el exceso de ellos los convierte en elementos tóxicos (Flórez, 2012; Ferrer, 2003).

En el sistema nervioso central (SNC) los metales de transición son necesarios para el buen funcionamiento de éste, dado que están involucrados en procesos como la mielinización, síntesis de neurotransmisores, respiración mitocondrial, como cofactores para enzimas, expresión génica, etc. A pesar de lo anterior, se ha evidenciado que los metales de transición están involucrados en desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington, ya que se ha encontrado acumulación de éstos en pacientes con estas enfermedades neurodegenerativas (Rivera-Mancia et. al., 2010).

Por otra parte, existen metales que no tienen una aparente función biológica como el plomo, cadmio, arsénico, etc., sin embargo se encuentran distribuidos ampliamente en el ambiente y aparecen en los sistemas biológicos como el sistema nervioso central ya que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, teniendo un efecto tóxico en el organismo, provocando desbalances en otros metales, cambiando la homeostasis celular o produciendo reacciones de oxidación (Ercal et al., 2001).

En este contexto, la generación de estrés oxidante ha sido considerada uno de los principales mecanismos por el cual los metales causan toxicidad, debido a que son capaces de llevar a entidades químicas altamente reactivas llamadas radicales libres, los cuales poseen la habilidad de causar peroxidación de lípidos, oxidación de grupos sulfhídricos de proteínas, daño al DNA y otros efectos severos. Adicionalmente, se sabe que los metales pesados al generar especies reactivas de oxígeno (ERO) llevan a los efectos tóxicos reflejados en hepatotoxicidad, nefrotoxicidad así como neurotoxicidad tanto en animales como en humanos (Leonard et al., 2004; Chen 2001).

Fierro

El fierro (Fe) es un metal con un número atómico 26 y una masa molecular de 55.85 g/mol. Se encuentra disponible en la naturaleza como parte de muchos minerales y óxidos, además de alimentos de origen animal y vegetal. La absorción de fierro se da por medio del intestino, y se distribuye ampliamente en músculo (mioglobina), hígado (almacenamiento), médula ósea, eritrocitos, macrófagos, etc. Un cuerpo humano adulto tiene en promedio de 45-55 mg de fierro por kilo (Rodríguez, 2009).

El hierro es un metal esencial en procesos celulares, las 2/3 partes del hierro orgánico es hierro funcional y la otra tercera parte está formando parte de enzimas como la hemoglobina, mioglobina, ferritina, hemosiderina, citocromo P450, etc., es muy útil porque funciona como un donador-aceptor de electrones. Además el hierro funciona como transportador de oxígeno, participa en la transferencia de electrones y síntesis de ADN; así como tiene un papel funcional en el cuerpo, estas mismas funciones pueden ser peligrosas, ya que su oxidación espontánea lleva a la producción de radicales libres y así a la reducción de moléculas celulares. La entrada de Fe a la célula se da por medio del transportador DMT1. En el cuerpo humano existen depósitos de almacenamiento de hierro, por ejemplo, la sangre (Rodríguez, 2009).

Adicionalmente, el hierro se ha relacionado con la EA, se ha sugerido su presencia en placas seniles y fibras neurofibrilares, además de que se ha responsabilizado de la generación de radicales libres que contribuyen a la agregación de A-beta promoviendo la unión de monómeros (Cheah et al., 2004).

En pacientes con EP el hierro se ha encontrado en concentraciones diferenciales en el cerebro. Las concentraciones de este metal se encuentran reducidas en el globo pálido e incrementadas en sustancia nigra pars compacta. La acumulación de hierro puede ser la causante de muerte neuronal (Dexter et al., 1989), y se propone como el principal mecanismo de daño en el SNC de estos pacientes. El consumo celular de hierro incrementa por estimulación de los receptores NMDA, ya que éste activa a la óxido nítrico sintetasa conduciendo a la activación de proteínas Dexas 1 las cuales vía DMT1, inducen el consumo de hierro (Cheah. et al., 2006).

En la EH, el hierro se ha encontrado incrementado en el núcleo caudado, putamen y ganglios basales (Dexter, 1992), además de encontrar los niveles de ferritina incrementados. Lo han sugerido como un causante de la expresión de la huntingtina. Por otra parte, algunas enzimas dependientes de hierro como la acotinasas y complejos de la mitocondria I-IV están disminuidas en pacientes con HD, lo que indica que probablemente las altas concentraciones de hierro podrían perturbar de manera indirecta el metabolismo energético por la generación de radicales libres (Browne et al., 1997).

En EAL los niveles de hierro se han encontrado incrementados y el hierro está posiblemente relacionados con el daño oxidante a través de la reacción de Fenton. Han sugerido que el incremento de este metal es porque se incrementa el consumo de éste (Berg y Youdim, 2006).

El efecto del hierro no se limita a las enfermedades neurodegenerativas, si no que existen modelos en donde el efecto del hierro es tóxico. La sobrecarga de hierro en rebanadas cerebrales produce un aumento en la lipoperoxidación de manera dosis dependiente cuando complejos de hierro con 8-hidroxiquinolina fueron agregados a las preparaciones (Oubidar et al., 1996). Rebanadas cerebrales expuestas a dosis crecientes (2, 10 y 50 μ M) de Fe(III) acomplejado con un lipofílico o hidrófilico muestran un aumento en la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), indicando que hay un aumento en la peroxidación de lípidos, y concluyen que el hierro celular es más propenso a causar un daño que el hierro extracelular (Demougeot et al., 2000). Por otra parte se ha observado en cultivos corticales que el citrato de hierro (1, 10 y 30

μM) es capaz de aumentar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa hasta un 60% en comparación del control, el co-tratamiento de fierro con algunos queladores no funcionó en forma protectora, al contrario, aumentaron su actividad tóxica (Rush et al, 2009).

Cobre

Específicamente, el cobre (Cu) es un elemento con número atómico 29 y una masa atómica de 63.546 g/mol. Se encuentra en forma Cu^{1+} y Cu^{2+} , principalmente en rocas, agua (más en la de mar que la dulce), sedimentos y en aire; se encuentra disponible en el ambiente gracias a las fábricas que lo utilizan como materia prima, agua residual doméstica, combustibles fósiles y combustión de desperdicios. La absorción del cobre se da principalmente por el intestino, es transportado hacia el hígado y de éste es repartido hacia sangre, cerebro y demás órganos. (Mercer, 2001)

El cobre actúa como un cofactor de enzimas que están relacionadas en la producción de hormonas (dopamina hidroxilasa) y tejidos, está involucrado en el metabolismo del fierro y en la inactivación de aminos bioactivas; además de ser parte de factores de coagulación y de enzimas como citocromo oxidasa, superóxido dismutasa dependiente de Zinc/Cu (SOD 1), ceruloplasmina y tioneínas. En el SNC el cobre es necesario para la respiración mitocondrial, para la biosíntesis de neurotransmisores. La distribución de este metal en el SNC se da por transportadores como el transportador de cobre I, la ATPasa transportadora de cobre tipo P (ATP7A para cobre) y el transportador divalente de metales (DMT1) (Fumero, 2013; Madsen y Gitlin, 2007; Peña et al., 1999).

Se ha reportado que las células que tienen mayor influencia en la homeostasis del cobre son los astrocitos, este tipo celular controla la homeostasis cerebral, además de ser probablemente el lugar de deposición de metales como el cobre y el plomo. En los últimos años se ha sugerido que los astrocitos participan activamente en el desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas (Tiffany-Castiglioni, 2011). En este contexto, el cobre se ha asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis amiotrófica lateral (EAL).

En la EA hay un desbalance en la homeostasis del cobre; un alto contenido de este metal fue encontrado de las placas amiloides y se sugiere que el cobre tiene una alta afinidad por Abeta, produciendo toxicidad por la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), llevando a una cascada de formación de radicales libres y estrés oxidante que llevan a la muerte neuronal. Adicionalmente, se ha observado que el complejo Abeta-cobre puede llevar a la inhibición de la citocromo oxidasa C y promueve la agregación de proteínas. La deficiencia de cobre puede alterar la actividad de proteínas de unión a cobre en EA, además de que se ha encontrado una actividad reducida en la SOD (Atwood et al., 2000; Cater et al., 2008).

Por otra parte, la EP ha sido correlacionada con el tiempo de exposición a este metal, es decir, se corre más riesgo de padecerla cuando se está expuesto a más de 20 años al cobre y aunque las concentraciones de cobre se han visto alteradas en pacientes con esta patología, éstas

no han sido muy claras. La concentración de cobre en el cerebro se ve disminuida en ciertas regiones (núcleo caudado y sustancia nigra pars compacta), pero se mantiene sin cambios en el líquido cerebro espinal (Rivera-Mancia et al., 2010)

En la EH las concentraciones de cobre se han encontrado tanto disminuidas como incrementadas, pero la concentración de cobre libre en líquido cerebroespinal se ha asociado con la etapa clínica y el tiempo después de la enfermedad, además de que éste es el que posiblemente ayuda a la agregación de la huntingtina (Dexter et al., 1992; Fox et al., 2007).

Se ha sugerido que en EH y EP el cobre libre es capaz de generar ERO y radicales libres por medio de la reacción de Fenton, llevando así a la generación de estrés oxidante, muerte neuronal y neurodegeneración (Rivera-Mancia et al., 2010).

En EAL las concentraciones de cobre se han visto alteradas al igual que en las demás patologías pero en ésta, esas concentraciones afectan directamente a la SOD, ya sea en la unión del metal con la SOD o bien, mutaciones en la enzima afectando su estructura y llevando a agregación de proteínas con efecto tóxico, daño oxidante y muerte celular (Rivera-Mancia et al., 2010).

Además de esta evidencia, existen reportes en donde el cobre actúa como tóxico. En rebanadas cerebrales el cobre es capaz de reducir la plasticidad sináptica y los potenciales mediados por NMDA, incluso en concentraciones bajas (1 μM) (Doreulee y Yanovsky, 1997); de la misma manera en ratas tratadas con cobre en el agua se observa una ausencia de la potenciación de estímulos a largo plazo, sugiriendo que el cobre reduce la sensibilidad sináptica y también la capacidad de facilitación. Estos efectos representan una alteración en la plasticidad asociada con el aprendizaje y la memoria (Goldschmith et al., 2005).

La sobrecarga de cobre (20-80 μM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) en líneas celulares de hígado y pulmón induce muerte celular por activación diferencial de calpaínas y caspasas, también provoca la reducción en el marcador de MTT, disminuyendo la viabilidad celular, incrementa las ERO y la peroxidación de lípidos (Arnal et al., 2012). Un estudio similar pero *in vivo* sugiere que el cobre administrado intraperitonealmente o vía oral, provoca el aumento en los marcadores oxidantes, sugiriendo que estos hallazgos son de vital importancia para ver el papel del cobre en el metabolismo cerebral y la sobrevivencia neuronal (Arnal et al., 2014). En cultivos astrocitos, el cobre (10 μM 0-17 h) induce daño oxidante, demostrado por el aumento de hidroperóxidos y la disminución en la viabilidad celular (Watt y Hooper, 2001).

Plomo

El plomo (Pb) es llamado un metal pesado y como sabemos no es un metal que se encuentre de manera normal dentro del cuerpo humano. Este metal tiene un número atómico de 82 y un peso molecular de 207.2 g/mol. El plomo de manera histórica ha estado presente en el ambiente ya que su ductilidad, alta densidad, poca reactividad química, su fácil extracción, su abundancia y relativo costo lo hicieron una materia prima de diversos procesos tecnológicos. El plomo fue usado en pinturas en los años 60's, actualmente se utiliza como un recubrimiento de

pipas que transportan agua; la biodisponibilidad del plomo en la actualidad está en las minas abandonadas, agua doméstica, en el aire, material para soldar, baterías, cosméticos, etc. (Garza et al., 2005)

El plomo entra al cuerpo por medio de la inhalación, por absorción de la piel, por absorción en el intestino y entra a las células de una manera muy fácil, ya que utiliza sistemas de transporte de calcio, zinc, magnesio que el cuerpo utiliza, tal es el caso del transportador divalente de moléculas catiónicas 1 o DMT1 (DCT1) (Ballatori, 2002); además el plomo tiene efecto en los receptores para NMDA, canales de potasio activados por voltaje, receptores colinérgicos y canales de calcio activados por voltaje. En estos últimos transportadores (canales de calcio activados por voltaje) son por los que el plomo tiene una gran afinidad por el transportados, haciendo que el transportador se bloquee por la acumulación de moléculas de plomo a través de él (Garza et al., 2005). Por otra parte, el plomo se une a la calmodulina, una proteína la cual actúa en las terminales sinápticas como un sensor de las concentraciones de calcio libre y como un mediador de la liberación de neurotransmisores (Sharma B et al., 2014).

El principal mecanismo de toxicidad del plomo se da por la sustitución de iones calcio de algunas proteínas, ya que es éstas cambian su estructura e incluso su función. Los ejemplos más comunes son las moléculas de adhesión/señalización intercelular como las moléculas de adhesión de células neuronales (NCAM) y las cadherinas, con lo cual es capaz de alterar los sistemas de señalización. Además, se ha observado que el plomo tiene un efecto muy grande en organelos como la mitocondria dado que se acumula dentro de ella, reduciendo el metabolismo energético celular, favoreciendo la producción de ERO, además de inhibir la entrada de calcio y promoviendo la salida de éste de la mitocondria (He et al., 2000). En el retículo endoplásmico inhibe el funcionamiento de la ATPasa de calcio y provoca la acumulación de proteínas mal plegadas en células. En el núcleo se une a cromatina y proteínas nucleares (Garza et al., 2005).

Adicionalmente, el estrés oxidativo inducido por el plomo incluye daño a la membrana celular y DNA, así como a enzimas (catalasa, SOD, GPx, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) y antioxidantes no-enzimáticos como el glutatión en sistemas animales y humanos (Valko et al., 2005, Flora et al., 2008). Por otra parte, el plomo induce cambios en la composición de lípidos y proteínas de membrana de células rojas e inhibe la síntesis de hemoglobina (Valko et al., 2005, Flora et al., 2006).

Diversos trabajos han reportado que el plomo aún a concentraciones bajas puede causar anomalías conductuales, deterioro de la audición, del aprendizaje y funciones cognitivas en humanos y modelos experimentales en animales (Lancranjan et al., 1975; Ruff et al., 1996). También se ha demostrado que el plomo causa una disminución permanente en la capacidad cognitiva en niños (Lockith et al., 1993). Se ha observado que los efectos de este metal en el SNC son más graves durante el desarrollo. En este contexto, la exposición de niños a plomo se correlaciona con decremento en el coeficiente intelectual.

Como hemos descrito, la toxicidad por exposición a metales pesados conlleva a muchos otros factores de toxicidad, como el daño oxidante, el déficit energético, deterioro cognitivo y la muerte celular, entre otros.

Estrés oxidante

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

Las ERO son moléculas que pueden interactuar con componentes celulares y pueden ser especies radicales, que son aquellas que tienen un átomo desapareado en la órbita externa y se forman por una ruptura homolítica y los no radicales. Los radicales se forman a partir del oxígeno molecular y dará paso a otros radicales como el singulete de oxígeno (1O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , no radical) y radical hidroxilo ($\bullet OH$). Las especies reactivas del nitrógeno, como el óxido nítrico pueden reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ y formar peroxinitrito ($ONOO^-$) y este a su vez puede dar lugar al ácido peroxinitroso y formar $\bullet OH$ (Selva-Rivas et al., 2011).

Las ERO participan en vías de señalización ya que median la transducción de señales que regulan la respuesta al estrés oxidante y así son responsables de la expresión de las enzimas antioxidantes y sistemas de defensa relacionados, pero también son moduladores de la respuesta inflamatoria y son responsables de procesos fisiológicos como la regulación de la constricción vascular y la regulación de la presión del oxígeno. Las ERO son capaces de activar la vía de las MAP cinasas que a su vez activan proteínas con importancia en la modulación de funciones celulares específicas como expresión de receptores, síntesis de neurotransmisores, producción de neuropéptidos, etc. Sin embargo, se sabe que las ERO tienen efectos nocivos en la célula ya que pueden interactuar con componentes celulares como proteínas, lípidos y DNA. El efecto de la oxidación de proteínas se puede dar a nivel de sitios de unión o la conformación estructural de las proteínas; la oxidación de DNA puede provocar mutaciones y tener un efecto directo en la replicación; la oxidación de lípidos, principalmente ácidos grasos insaturados, puede generar peroxidación de lípidos, los cuales a su vez pueden oxidar a los lípidos cercanos y finalmente generar una reacción en cadena cuyos productos de esta reacción son el 4-hidroxinonal y malonaldehído, los cuales sirven como marcadores de estas reacciones (Selva-Rivas et al., 2011, Coyle y Outtfarcken, 1993; Andersen, 2004).

La producción ERO se da de manera natural dentro de la célula a causa de procesos metabólicos como la oxidación de moléculas pequeñas. Las enzimas son una de las principales fuentes de producción de ERO ya que generan radicales libres durante su ciclo catalítico (xantina oxidasa, triptófano dioxigenasa, etc.). La mitocondria es el organelo que consume más del 90 % de oxígeno de la célula y es el mayor productor de radicales debido al metabolismo del oxígeno que

consume. Estructuras celulares como el retículo endoplásmico y la membrana nuclear contienen citocromos (P450 y b5) que son capaces de oxidar a ácidos grasos insaturados. Otra de las fuentes productoras de ERO son los peroxisomas ya que por su alta concentración de oxidasas son fuente de producción de H₂O₂. Aunado a esto se sabe que también las ERO pueden ser producidas por agentes externos como son las fuentes ambientales como el ozono, pesticidas, hiperoxia, el humo de tabaco, solventes, anestésicos, hidrocarburos aromáticos, etc. (Selva-Rivas et al., 2011).

El estrés oxidante es importante en el desarrollo en las enfermedades degenerativas como la diabetes o el cáncer pero también en desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, Parkinson o Huntington, incluso en la vejez, sin embargo aún no se tiene claro si el estrés oxidante es una causa o una consecuencia de cada una de ellas, pero todas ellas tienen en común factores como: la disfunción mitocondrial, estrés oxidante, presencia de agregados anormales de proteínas, excitotoxicidad y alteración del metabolismo de hierro (Shukla et al., 2011).

Uno de los órganos más vulnerables al daño oxidante es el sistema nervioso central debido a que está compuesto por una alta cantidad de lípidos, por la demanda de oxígeno que requiere para su alta actividad y además por los bajos niveles de expresión y actividad de sistemas antioxidantes. Es claro que para el buen funcionamiento del SNC es necesario que las conexiones entre células neuronales sean correctas; el estrés oxidante es capaz de alterar estas conexiones produciendo daño oxidante, pérdida de procesos (como la comunicación neuronal), la muerte de las sinapsis y la alteración de formación de nuevas células. Las especies reactivas producen oxidación de lípidos, proteínas y DNA, desacoplamiento de proteínas e incluso cambia la membrana celular produciendo un desbalance neuronal. Smythies (1999) propone que es muy importante un estado redox en la plasticidad cerebral en el cual un ambiente oxidante provoca un estado de estrés, en donde las ERO causan la eliminación de espinas celulares; pero que en un ambiente antioxidante es posible que las sinapsis se conserven e incluso su número aumente (Shukla, et al., 2011).

En base a estos antecedentes podemos decir que muchos factores están involucrados con la vulnerabilidad celular durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, dentro de estos factores se encuentran el ambiente redox, la presencia de algunos metales, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, y todos ellos pueden converger y llevar a la degeneración y muerte celular. Sin embargo, es importante considerar los metabolitos endógenos que pueden estar influenciando ya sea de manera positiva o negativa la toxicidad inducida por estos metales. Otro factor importante en el SNC, son los metabolitos del catabolismo del triptófano ya que poseen propiedades redox y neuroactivas. Se sabe que la actividad de estos metabolitos es susceptible a los cambios en el microambiente celular.

La vía de la kinureninas

El triptófano es un aminoácido esencial e indispensable ya que es utilizado para la síntesis de niacina, serotonina y proteínas. La degradación del triptófano toma varias rutas de degradación entre ellas: la formación de compuestos no aromáticos del triptófano, (1-2 % por la vía del

glutarato), en la vía de la serotonina (1-2 %), en la biosíntesis de melatoninas, en la formación de 3-indoxisulfato (3 % por acción de una bacteria intestinal), en la formación de ácido 3-indoleacético (3-4 %); sin embargo la mayor ruta metabólica a través de la cual se degrada más del 90 % del triptofano es la vía de la kinurenina (VK) (Allegri et al., 2003). La VK es la ruta principal de la degradación de triptofano en mamíferos (Pearson y Reynolds, 1992), cuyo producto final es la formación de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD^+), una coenzima involucrada en procesos celulares básicos, funcionando como un donador y aceptor de electrones. Esta vía es muy activa, aunque la actividad de cada una de las enzimas involucradas difiere entre especies. La VK se ha encontrado presente en cerebro e hígado en mamíferos como cerdos, ratas, ratones, conejos y primates (Moroni et al., 1984). Recientemente se ha asociado el desbalance en la producción de los metabolitos de la VK con diversos desórdenes neurodegenerativos, ya que muchos de ellos tienen propiedades neuroactivas y redox (Lapin 1980; Stone 1993; Lugo Huitrón et al., 2011).

La VK se lleva a cabo por varios pasos, el primer paso enzimático de la VK es llevado a cabo por dos enzimas: triptofano-2,3-dioxigenasa (TDO) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), ambas rompen el anillo de triptofano para transformarlo en N-formil kinurenina. La enzima TDO está altamente expresada en el hígado y es capaz de metabolizar L- pero no D-triptofano, en cambio IDO es capaz de metabolizar tanto L- como D-triptofano y se encuentra en diversos órganos del cuerpo humano incluyendo el SNC.

El siguiente paso de la vía está a cargo de la kinurenina formidasa, la cual metaboliza a la N-formil kinurenina en L-kinurenina., se ha encontrado en hígado de caballo, rata, conejo y cerdos (Rikio S. e Isao, I., 1969; Reyes O., J. et al., 2014).

La L-kinurenina es la responsable de la formación de tres compuestos ya que es sustrato de cuatro enzimas:

- La kinurenina aminotransferasa (2 isoformas: KAT I y KAT II en humanos) que da paso a la formación de ácido kinurénico (KYNA). KYNA es el único antagonista de receptores para NMDA endógeno conocido hasta el momento, tiene la capacidad de inhibir a los receptores $\alpha 7$ -nicotínicos y ha mostrado ser un agente anticonvulsivo por estas características (Foster et al., 1984). Recientemente se encontró que KYNA es un atrapador de radicales como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), peroxinitrito (ONOO^-) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), además de que es capaz de reducir el daño oxidante provocado por agentes pro-oxidantes, por lo que es considerado un antioxidante endógeno (Lugo-Huitrón et al., 2011).
- La kinureninasa que forma ácido antranílico (AA). La kinureninasa es una enzima que preferencialmente reacciona con kinurenina. (Phillips, R.S., 2013; Reyes O., J. et al., 2014).
- La kinurenina 3-hidroxilasa que forma 3-hidroxikinurenina (3-HK). La kinurenina 3-hidroxilasa es una enzima que se localiza en la membrana exterior de la mitocondria y se ha demostrado que tiene una alta afinidad por el sustrato, lo que sugiere que la kinurenina 3-hidroxilasa metaboliza más L-kinurenina que las demás enzimas (Moroni, 1999; Okuno et al., 1991; Pérez-de la Cruz et al., 2008). 3-HK es un metabolito del que

existen reportes duales en donde la proponen como un potencial causante de muerte celular y generador de ERO (Okuda et al., 1998; Nakagami et al., 1996, Goldstein et al., 2000); además de provocar agregados de proteínas, interacciona con metales pudiendo ser la causa de la formación de cataratas (Vazquez, 2001). Por otra parte, hay otros reportes en donde 3-HK es capaz de disminuir parámetros de estrés oxidante; además de que se ha observado que puede ser un atrapador de radicales libres como $O_2^{\bullet-}$ (Goshima et al., 1986; Wadano et al., 1993).

Posteriormente la kinureninasa lleva a cabo la formación de ácido 3-hidroxiantranílico (HANA) a partir de 3-HK. HANA también puede ser formado a partir de la hidroxilación de AA. HANA es uno de los metabolitos de los que existen estudios ambiguos sobre su comportamiento y acción en diferentes experimentos, por ejemplo, es causante de toxicidad en cultivos neuronales sin selectividad de región (Okuda, et al., 1998), es capaz de producir daño a proteínas por la aparente interacción con los metales de éstas, además de producir radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton, pero a la vez, funciona como un sitio de ataque de los radicales hidroxilo (Goldstein et al., 2000). Además, en diversos estudios se observa que HANA puede tener un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa y es capaz de disminuir el consumo de oxígeno (Quagliarello et al., 1964); sin embargo, a pesar de tantos informes que indican que este compuesto es un pro-oxidante, Leipnitz y sus colaboradores (2007) demostraron que HANA funciona como un atrapador de radicales libres y es capaz de disminuir las especies reactivas del oxígeno (ERO).

El HANA es el sustrato para la 3-hidroxiantranilato-3,4-dioxigenasa, la cual convierte al HANA en un intermediario muy inestable (2-amino-3-carboximuconatosemialhéido) que sufre ciclización espontánea y da lugar a ácido quinolínico (QUIN) (Moroni et al., 1999; Okuno et al., 1991; Pérez-de la Cruz et al., 2008). QUIN es un agonista de receptores NMDA, en modelos experimentales se ha mostrado que es un agente pro-convulsivo y dentro del patrón de daño que genera, se encuentra la disfunción mitocondrial progresiva, producción de radicales libres y muerte celular (Bordelon et al., 1997; Moroni et al., 1984). Los niveles de QUIN están elevados en el líquido cerebrospinal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida y en pacientes con VIH. El QUIN ha sido un buen modelo para simular los síntomas tempranos de la enfermedad de Huntington ya que la lesión en estriado con QUIN en monos producen distonia y disquinesia (Stone, 1993).

Finalmente el QUIN es convertido en NAD^+ por medio de la enzima ácido quinolínico fosforibosil transferasa (Stone, 1993).

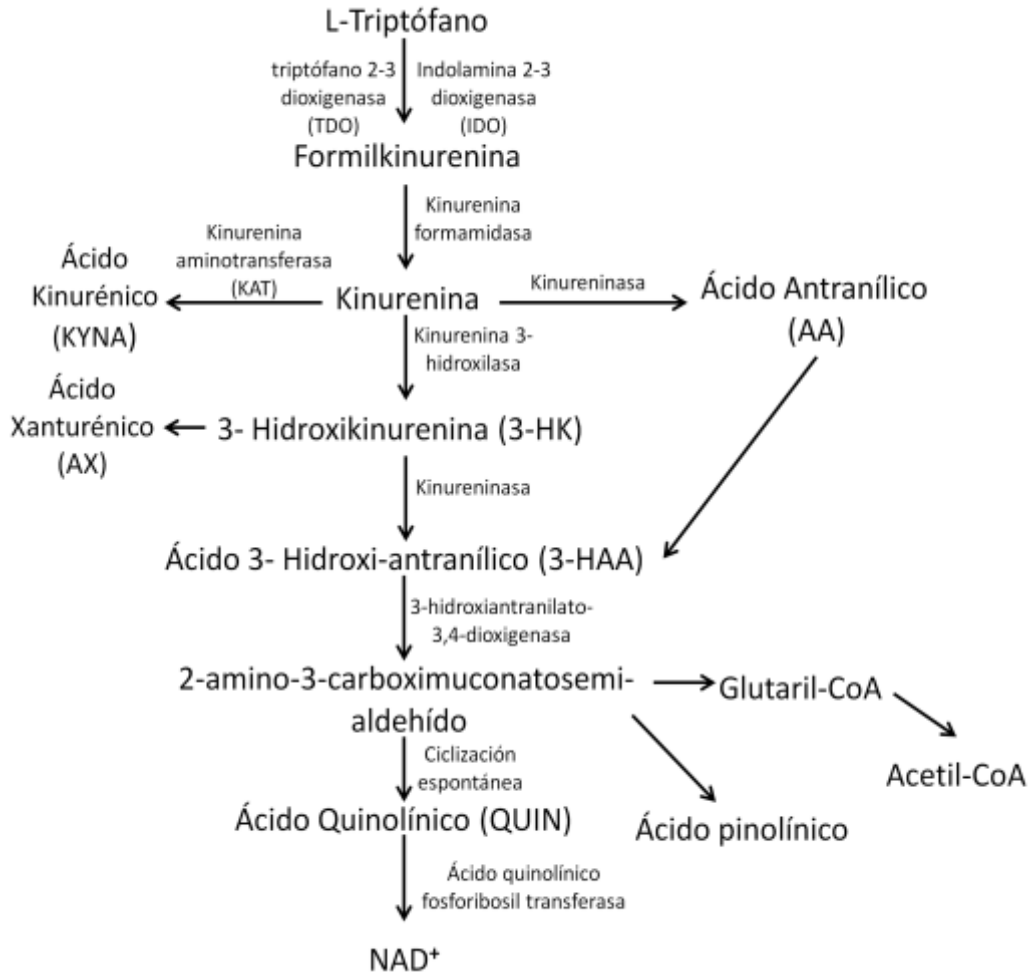


Fig 1. Metabolismo del triptófano: vía de la kinurenina (Tomado y modificado de Allegri et al., 2003).

Enzimas de la vía de la kinurenina

La IDO es una enzima monomérica con una longitud de 403 aminoácidos y 45kDa; tiene como sustratos indolaminas como el L-triptófano, melatonina y la serotonina, su grupo prostético es un grupo hemo necesario para la actividad de esta enzima además de contar con dos moléculas de cobre; tiene varios ligandos como el O₂, CO y cianuro (O. Brady, 1975(2)), es dependiente preferentemente de anión superóxido pero también es capaz de utilizar oxígeno molecular en lugar de éste para romper el anillo de triptófano (Tuhong D., et al., 2000; Werner, E. y Werner-Felmayer, G; 2007). La IDO es inhibida por óxido nítrico y la superóxido dismutasa (Moroni, 1999; Watanabe et al., 1981). Se ha demostrado que esta enzima tiene la capacidad de unir Cu(II) pero no Cu (I), además de que el cambio de Cu (II) a Cu (I) se da dentro de la enzima y está implicado fuertemente en la catálisis de la IDO (O. Brady, 1975).

La IDO es expresada en placenta, intestino, pulmón, colon, bazo, estómago y cerebro. La inhibición de la actividad de esta enzima puede atenuar la habilidad de los tumores para evadir la supervisión inmune y promover la separación; sin embargo, el incremento en la actividad de la IDO puede activar la inhibición de la actividad de células T y un incremento en la actividad de la vía de la kinurenina produciendo la neurotoxina ácido quinolínico, además de verse asociada con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), depresión, cataratas relacionadas con la edad y encefalitis VIH (Nicholas y Shane, 2007; Qiang H, et al., 2011).

La formamidasa es una enzima que se ha encontrado en hígado y cerebro de caballos, conejos, ratas y cerdos; tiene reguladores positivos como el ácido ascórbico y L-triptofano; pero hay otros negativos, como otros metabolitos de la vía como 3-HK, ácido antranílico y manganeso (Rikio S, e Isao, I., 1969; Reyes O., J. et al., 2014).

La kinureninasa es la primera enzima piridoxal-5'-fosfato dependiente descubierta; tiene un sitio activo muy conservado y se ha encontrado en bacterias y humanos. Es regulada positiva por 3-HK y agua y hasta el momento no se conocen reguladores negativos; sin embargo se han utilizado inhibidores como o-metoxibenzoilalanina (Phillips, R.S., 2013; Reyes O., J. et al., 2014).

Las KAT's se han encontrado cuatro isoformas I-IV. La KAT I prefiere como co-sustratos el piruvato y el piridoxal-5-fosfato; es fuertemente inhibida por los sustratos como triptofano, fenilalanina y glutamina; se ha encontrado localizada principalmente en astrocitos. La KAT II tiene como sustrato el oxoglutarato. (Wong et al., 2011; Reyes et al., 2014). Estas enzimas son muy sensibles al pH, pero en especial la KAT I la cual tiene un pH óptimo de 10, mientras la II tiene un pH óptimo de 7.4 (Wong, J., J. Ray, W., Y. Kornilova, A., 2011; Smithdt, W., Guidetti, P. Okuno, E. y Schwarcz, R. 1993).

La 3-hidroxilasa o llamada también 3-monooxigenasa es una enzima determinante en la vía entre la síntesis de 3-HK y ácido quinilínico, es expresada en neuronas pero principalmente en microglia. Esta enzima tiene reguladores positivos como NADPH, O₂, FAD, NADH y reguladores negativos como ácido antranílico, ácido xanturénico y piridoxal-5-fosfato (Amaral, M. et al., 2013; Reyes O., J. et al., 2014). La 3-hidroxiantranilato-3,4-dioxigenasa tiene como reguladores positivos el O₂ y el Fe²⁺ y como reguladores negativos el Zn²⁺ (Reyes et al., 2014).

Hasta el momento no hay un solo estudio que se halla enfocado en ver si la intoxicación por algún metal lleva a alteraciones en los metabolitos y enzimas de la vía de kinurenina, sin embargo no es difícil pensar que esto puede estar ocurriendo ya que dentro de los efectos tóxicos de estos metales se ha reportado daño oxidante e inflamación, factores que como describimos anteriormente están relacionados con la modulación de la VK.

Justificación

En los últimos años han cobrado gran importancia los metales pesados ya que constituyen hoy en día un factor de riesgo químico para la salud pública, debido a su amplia variedad de aplicaciones en la vida humana, sobre todo en los procesos industriales donde su uso es extenso. La exposición a este tipo de metales está relacionada con alteraciones en la cognición, memoria y aprendizaje en niños y adultos, además que también presentan otro tipo de factores de toxicidad como el estrés oxidante, el déficit energético y muerte celular. En este contexto, también se sabe que los metabolitos de la vía de la kinurenina son muy sensibles al estado redox celular y que dependiendo de éste pueden estar regulando estos mismos factores de toxicidad por los cuales los metales ejercen su acción toxica. Es por ello la importancia en determinar si hay una correlación entre la presencia de estos metales y las alteraciones ya sea en la enzimas y/o metabolitos de la vía de la kinurenina, con la finalidad de evidenciar mecanismos no descritos, que permitan en un futuro utilizarlos como marcadores de predicción o bien diseñar estrategias para mejorar la calidad de vida de sujetos que fueron expuestos o estén expuestos al metal.

Hipótesis

Si la vía de la kinurenina es altamente regulada por el perfil redox celular, entonces una alta concentración de los niveles de fierro, cobre o plomo causará afectación en la funcionalidad de enzimas de la vía y en la producción de sus metabolitos.

Objetivo general

Evaluar el efecto del fierro, cobre y plomo en la generación de los diferentes metabolitos de la vía de la kinurenina, así como también, ver el efecto de la co-incubación de éstos con metabolitos de la vía.

Objetivos particulares

- Estandarizar el tiempo de incubación y la concentración de fierro, cobre y plomo que se utilizará en rebanadas cerebrales de corteza.
- Evaluar las especies reactivas del oxígeno, peroxidación lipídica, la viabilidad celular, la actividad de LDH y evaluar muerte celular en rebanadas cerebrales de corteza en presencia de los metales pesados.

- Evaluar la actividad de enzimas de la vía como la KAT, la IDO y la KMO en rebanadas corticales en presencia de hierro, cobre y plomo.
- Evaluar el efecto del plomo y cobre en astrocitos primarios de rata por medio de la cuantificación de las especies reactivas del oxígeno, la viabilidad celular, la actividad de LDH, ioduro de propidio y medición de potencial de membrana mitocondrial.
- Cuantificar los metabolitos de la vía en astrocitos primarios de rata expuestos a hierro, cobre y plomo.
- Medir la actividad de enzimas de la vía en astrocitos primarios de rata expuestos a hierro, cobre y plomo.

Métodos

Reactivos

Acetato de plomo (PbAc), ácido tiobarbitúrico (TBA), FeSO_4 , 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo (MTT) y demás reactivos fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Las soluciones y reactivos se prepararon con agua desionizada obtenida de un sistema purificador (Direct-Q, Millipore) y por medio de sonicación (Branson 2210).

Animales

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

Cultivo de astrocitos primarios

Los cultivos de astrocitos se obtuvieron a partir de las cortezas cerebrales de ratas neonatas (un día postnatal). Una vez extraído el cerebro, se mantuvo en solución salina Hank's equilibrada sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , se retiraron cuidadosamente las meninges y posteriormente el tejido fue incubado a 37°C por 10 min. Después, el tejido cortical se disoció mecánicamente, la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se decantó. Las células disociadas se resuspendieron en medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y un cóctel de antibióticos (penicilina/estreptomina y fungisona). Las células se sembraron en frascos de 75 cm^2 pretratados con poli-D-lisina y se mantuvieron en incubación. El medio fue cambiado al día siguiente y posteriormente cada cuatro días. Entre los días 12 a 15, cuando los cultivos alcanzaron confluencia, se agitaron durante 15 horas para remover la microglia. Limpios de microglia, los frascos se tripsinizaron y las células se sembraron en placas a la densidad necesaria para los experimentos requeridos.

Preparación de rebanadas

Las rebanadas cerebrales (200–300 nm of grosor) fueron obtenidas en fresco de ambos hemisferios de cerebros de ratas usando un cuchilla para tejido e inmediatamente transferidas a un buffer Krebs pH 7.4 (conteniendo 19 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM glucosa, 13 mM NaH₂PO₄ y 3 mM Na₂HPO₄). Grupo de 5 rebanadas por prueba fueron incubadas en buffer Krebs (volumen final de 800 ml) en un baño caliente en presencia de concentraciones conocidas de FeSO₄ (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 μM), CuSO₄ (10, 50, 100, 250, 350 y 500 μM) y PbAc (10, 50, 100, 250 y 500 μM). Todas las incubaciones fueron a 37° C durante 2 h para FeSO₄ y CuSO₄ y 4 horas para PbAc. Las muestras fueron recolectadas inmediatamente después de la incubación, se tomaron 200 μl del medio para realizar actividad de LDH y el resto se homogenizó para hacer posteriormente las pruebas de ERO, MTT y TBA-RS.

Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

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

Determinación de peroxidación de lípidos (PL)

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

Estimación de la viabilidad celular

La evaluación de la funcionalidad celular se realizó por medio de la reducción de MTT, se incubaron 200 μL de los homogenados en presencia de los diferentes tratamientos a 37°C durante

2 h, al finalizar la incubación se agregaron 4 μL de MTT (5 mg/mL) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 4,000 x g durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se le agregaron 500 μL de isopropanol ácido al botón para resuspender. Se obtuvo la densidad óptica en un espectrofotómetro Genesys 8 a la longitud óptica de 570 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína. Los resultados se expresaron como porcentaje, tomando el control como el 100 %.

Actividad de lactato deshidrogenasa.

Para la evaluación de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) se tomaron 200 μl del medio en donde se incubaron las rebanadas al finalizar la incubación, posteriormente se diluyó la muestra 1:2 con buffer Krebs pH 7.4, se le añadió piruvato 23 mM y β -NADH 0.2%. Se hicieron cinéticas durante 2:30 minutos cada 5 segundos a una longitud de onda de 340 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

Cuantificación de proteína por Lowry

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry en donde se tomaron 2 μl del homogenado y se llevó a un volumen final de 200 μl con agua. Se le agregó 1 ml de solución C (Solución A: Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4% y tartrato de sodio 0.2% + solución B: $\text{Cu}(\text{SO}_4)_3$ 0.5% en agua). Se agitó y se esperó 10 minutos. Se les agregó 100 μl de reactivo Folin al 50% con agitación simultánea, se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia fue determinada a 550 nm.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial por JC-1

Una vez tratadas las rebanadas o los cultivos celulares con los metales o kinureninas se utiliza la tripsina para disgregar tejido o para despegar las células de la placa, se detiene la reacción de dicha enzima con medio con contenido de suero bovino, se realizan lavados de las muestras con el buffer de ensayo (1x). Se tiñen las células o el tejido disgregado con JC-1 (1:10), se incubaron durante 15 min a 37° C, se realizaron otros dos lavados con el buffer de ensayo (1x) y posteriormente se leyeron por citometría

Ioduro de propidio

Una vez tratadas las rebanadas o los cultivos celulares con los metales o kinureninas se utiliza la tripsina para disgregar tejido o para despegar las células de la placa, se detiene la reacción de dicha enzima con medio con contenido de suero bovino, se realizan lavados de las muestras. Se tiñen las células o el tejido disgregado con ioduro de propidio (5 μM /300 μL), se incubaron durante 15 min a 37° C y posteriormente se leyeron por citometría.

Evaluación de la actividad de IDO

Después del tratamiento a las rebanadas corticales de cerebro de rata con cada metal, las rebanadas fueron homogenizadas en 500 µl de PBS pH 6.5 y se tomaron 100 µl para ser incubados con 100 µl de buffer de ensayo (400 µM de triptofano, 20 µM de ascorbato (neutralizado), 10 µM de azul de metileno, 100 µg/ml de catalasa (200 U) y 50 mM de PBS pH 6.5); se incubaron durante 1 hora a 37° C y se detuvo la reacción con 40 µl de TCA al 30%. Las muestras se calentaron a 65° C durante 15 minutos y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se determinó la cantidad de L-kyn formada, por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La presencia de L-kyn fue determinada por HPLC, mediante un método de fase reversa (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 2.5% 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 4 y se detectó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión 480 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína (Matin, A.; 2006).

Evaluación de la actividad de las KAT's

La actividad de las KATs fue evaluada en las rebanadas corticales de rata. Las rebanadas fueron homogenizadas en 500 µl de buffer de homogenización (buffer tris-base pH8, piridoxal 5-fosfato, mercaptoetanol). Se tomaron 100 µl de ese homogenado y se le agregaron 100 µl del cocktail (L-kinurena, piridoxal 5-fosfato, piruvato sódico, y buffer Tris-acetato pH7.4), se incubó durante una hora a 37°C; se detuvo la reacción con 20 µl de TCA al 50% y 1 ml de HCl 0.1 M, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm, se obtuvo el sobrenadante y se inyectaron al HPLC, 20 µl del mismo.

La presencia de KYNA fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución, mediante un método de fase reversa (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. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

Evaluación de la actividad de la KMO

La actividad de la enzima kinurena 3-monooxigenasa fue evaluada con 80 µl de homogenizado (en 500 µl de buffer 100 mM de Tris-HCl pH 8.1 (10 mM KCl y 1 mM de EDTA)) de rebanadas corticales de rata con 120 µl de buffer de ensayo (1 mM de NADPH, 3 mM de glucosa 6-fosfato, 1 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 100 µM de L-kinurena, 10 mM de KCl y 1 mM de EDTA), las muestras se incubaron 40 minutos a 37° C, al término de la incubación la reacción fue detenida con 50 µl de ácido perclórico al 6% y se centrifugaron a 12500 rpm durante 15 minutos.

La presencia de 3-HK fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución, mediante un método de fase reversa (columna HR-80; ESA, Thermo Scientific) y una fase móvil de acetato de zinc 100 mM y acetonitrilo 3% en un pH final de 4.9 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 3-HK es en el minuto 1.5 y se detectó por UV-vis a una longitud de onda de 238 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína (Zwilling, D., et al., 2011).

Estadística

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

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

RESULTADOS

EFECTO DEL PLOMO

Efecto del PbAc en rebanadas corticales de rata

Rebanadas de corteza cerebral fueron incubadas en presencia de PbAc (50, 100, 250, 500 μM y 1mM) durante 4 horas a 37 °C. En la figura 2 se muestra el efecto del PbAc sobre A) producción de ERO, B) peroxidación de lípidos, C) la actividad de la LDH y D) funcionalidad celular. El control se considera como el 100%. Se observa que el PbAc no aumenta las especies reactivas de oxígeno pero sí la peroxidación de lípidos, la cual sabemos que es un marcador tardío de la presencia de especies reactivas del oxígeno. Adicionalmente, este metal es capaz de aumentar la actividad de la LDH significativamente, sugiriendo que hay muerte celular. Sin embargo, la funcionalidad celular evaluada por la reducción de MTT incrementa de manera concentración-dependiente.

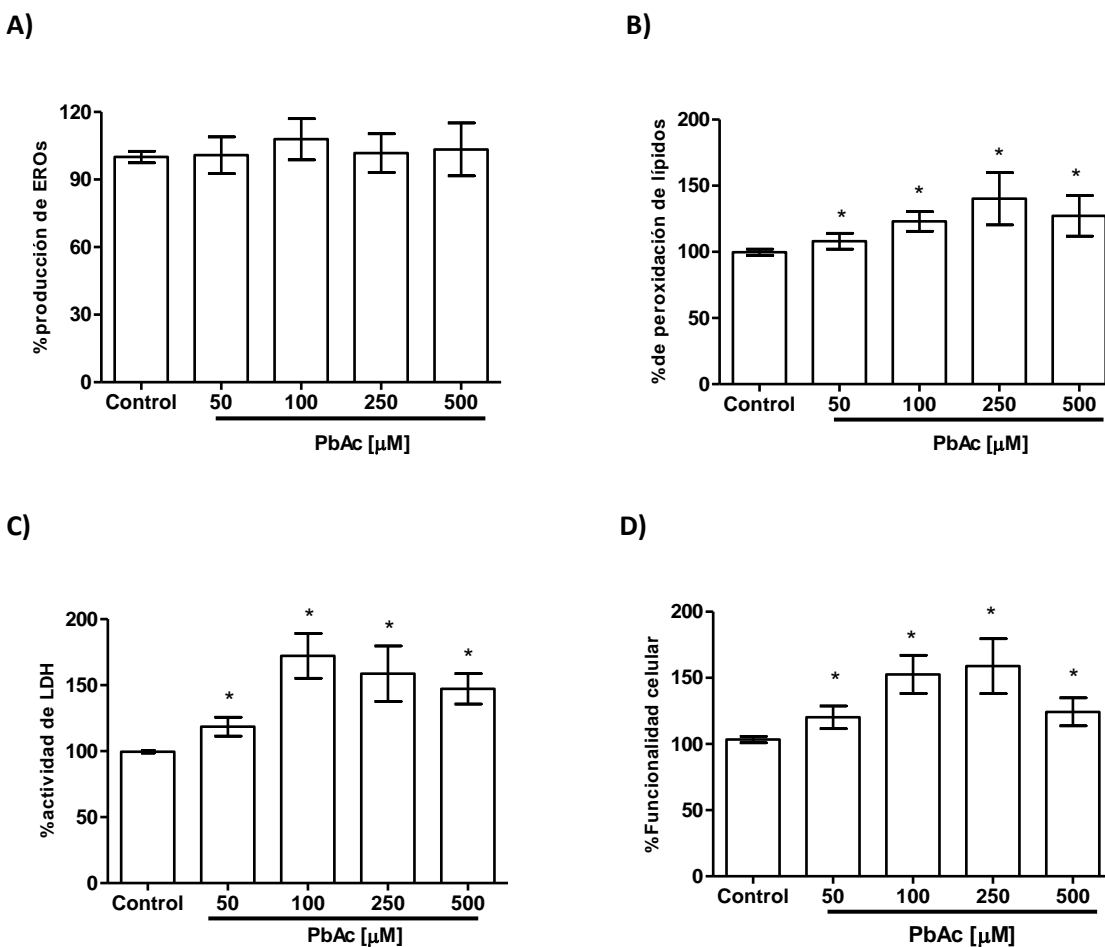


Fig. 2 Efecto de PbAc sobre la actividad de ERO (A), PL (B), LDH (C) y MTT (D) en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 8 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Efecto del PbAc en la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina en rebanadas de corteza de rata

Después de 4 h de incubación con el PbAc, se determinó la actividad de 3 enzimas de la vía: Indolamino 3-dioxigenasa (IDO), kinurenina aminotransferasas (KAT's) y kinurenina 3-monooxigenasa (KMO) en homogenados de rebanadas corticales de rata.

Actividad de la IDO

Se determinó la actividad de la IDO por medio de la producción de L-kyn. Lo que se observa es que el plomo es capaz de incrementar significativamente la actividad de la IDO a partir de la concentración de 250 μM (Fig. 3).

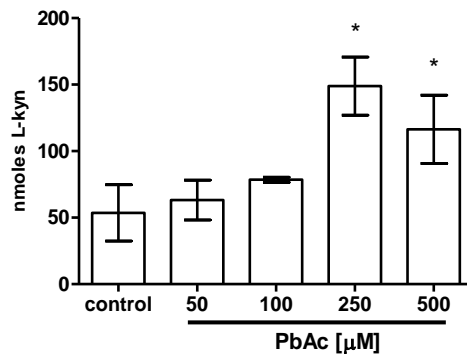


Fig 3. Efecto de PbAc sobre la actividad de la IDO en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Actividad de las KAT's

La actividad de las KATs se determinó por la cantidad de ácido kinurénico después de la incubación con los sustratos. Lo que se observa es que el plomo aumentó discretamente la actividad de estas enzimas, pero sólo a las concentraciones de 50 y 100 μM .

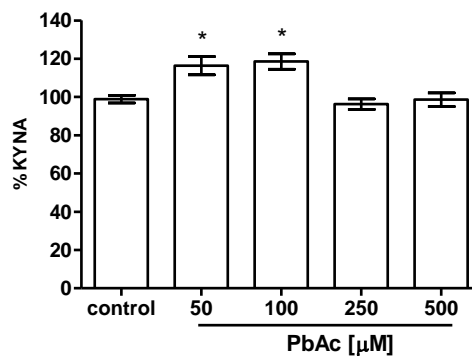


Fig. 4 Efecto de PbAc en la actividad de la KAT en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 8 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Actividad de la KMO

La actividad de la KMO se midió por medio de la medición de 3-HK. El PbAc no tiene efecto alguno en el funcionamiento de esta enzima, en ninguna de las concentraciones probadas.

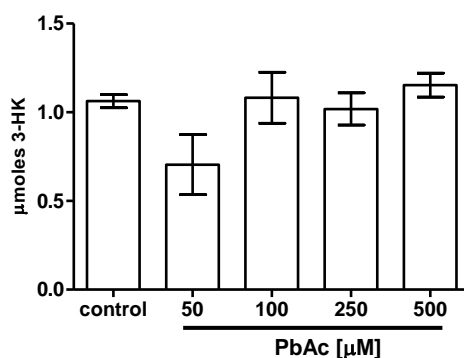


Fig. 5 Efecto de PbAc sobre la actividad de la KMO en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Efecto del PbAc en astrocitos primarios de rata

Los astrocitos primarios de rata fueron expuestos a diferentes concentraciones de PbAc (10, 50, 100, 250, 500 µM y 1mM) durante 24 horas, una vez terminado el tiempo de incubación se evaluó la funcionalidad celular a través de la reducción de MTT. En la figura 6A se observa que el plomo es capaz de generar especies reactivas (Fig. 6A), y también encontramos que hay una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Fig. 6B). Además, se muestra que el plomo es capaz de disminuir la funcionalidad de manera concentración dependiente (Fig. 6C), lo cual correlaciona con un aumento en la actividad de lactato deshidrogenasa (Fig. 6D) y ambos marcadores sugieren que hay muerte celular.

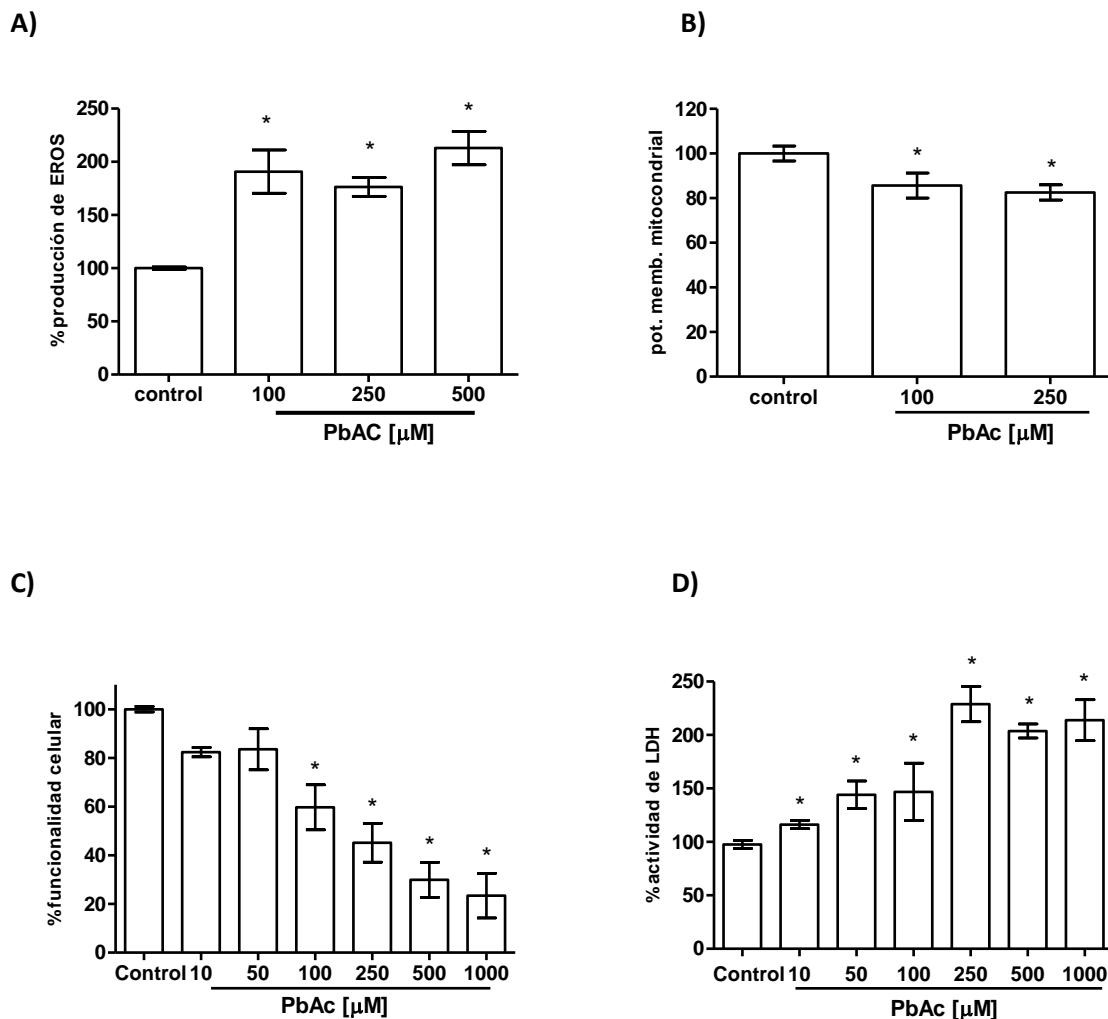


Fig. 6 Efecto de PbAc sobre MTT (A), la actividad de LDH (B), producción de ROS (C) y JC-1 (D) en astrocitos primarios de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Efecto del PbAc en la actividad de las enzimas de la VK en astrocitos primarios de rata

Efecto del PbAc en la actividad de las KATs en astrocitos primarios de rata

En paralelo a los marcadores de muerte y daño oxidante, se evaluó la actividad de las KATs. Lo que se observa en la Fig. 7 es el PbAc es capaz de incrementar la actividad significativamente con la exposición a PbAc a 250 μ M.

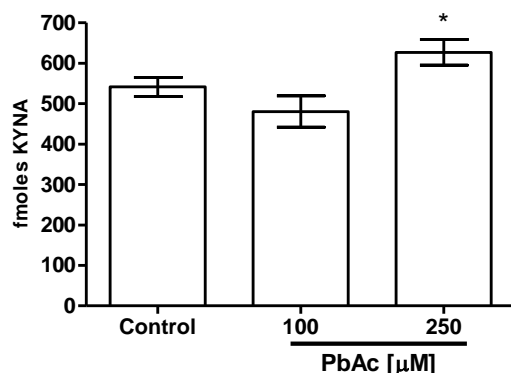


Fig. 7 Efecto de PbAc sobre la actividad de la KAT en astrocitos primarios rata. Se presenta la media + S.E.M. de 8 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Efecto de la co-incubación de PbAc con metabolitos de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata

Posteriormente se evaluó el efecto de la co-incubación de PbAc (250 µM) con algunos metabolitos de la vía de la kinurenina que presentan actividad redox (3-HK y HANA (50 µM) y L-kyn 1 µM). En la figura 8A se observa que el efecto del PbAc sobre la producción de ERO se ve atenuada en presencia de 3-HK y HANA. Adicionalmente, en la figura 5B se observa que el plomo disminuye la funcionalidad celular, mientras que la co-incubación de este metal con 3-HK y HANA fue capaz de atenuar parcialmente el efecto en este marcador celular. La co-incubación con L-Kyn no presentó efecto alguno en ninguno de los dos marcadores (datos no mostrados).

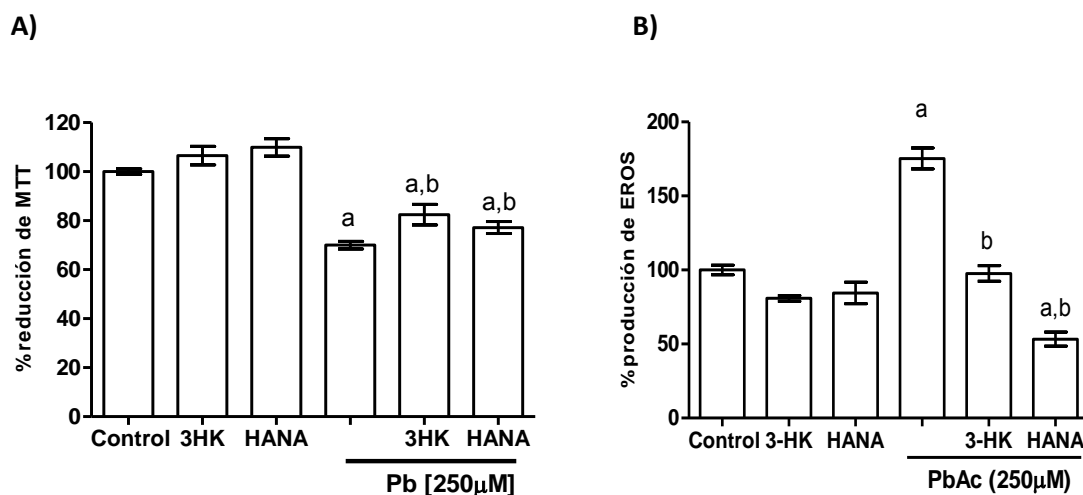


Fig. 8 Efecto de la combinación de PbAc (250 µM) con L-kyn (1 µM), 3-HK (100 µM) y HANA (100 µM) en la producción de ERO (A) y en la reducción de MTT (B). Se presenta la media + S.E.M. de 4-6 experimentos por concentración. a) $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control y b)

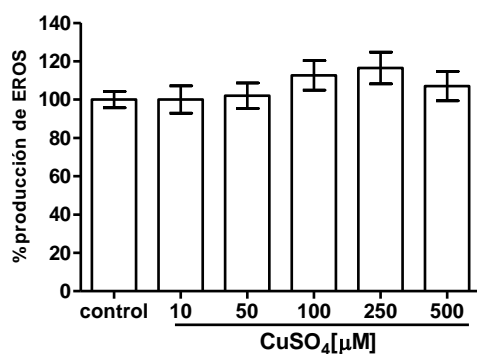
valores diferentes a PbAc (250 μM). Se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

EFFECTO DEL COBRE

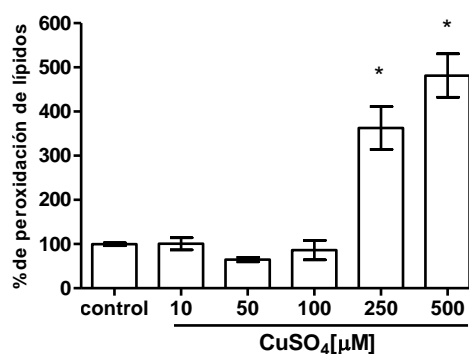
Efecto de CuSO_4 en rebanadas corticales de rata

Se probaron diferentes concentraciones de CuSO_4 (10, 50, 100, 250 y 500 μM) en rebanadas de corteza cerebral durante 2 horas. En la figura 9 se muestra el efecto del CuSO_4 sobre la producción de ERO, peroxidación de lípidos, actividad de la LDH y funcionalidad celular. El control se toma como el 100%. El CuSO_4 no tuvo efecto en la producción de ERO pero si fue capaz de aumentar la cantidad de lípidos peroxidados en las concentraciones más altas (350 y 500 μM). Por otro lado, el CuSO_4 disminuyó la actividad de la enzima LDH y la funcionalidad celular.

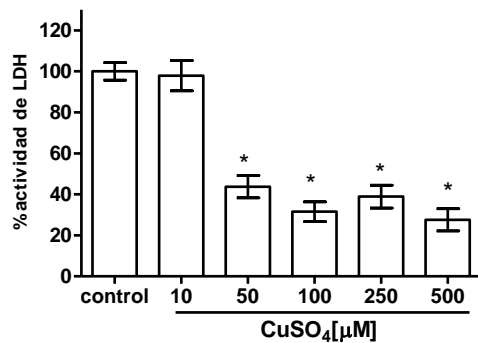
A)



B)



C)



D)

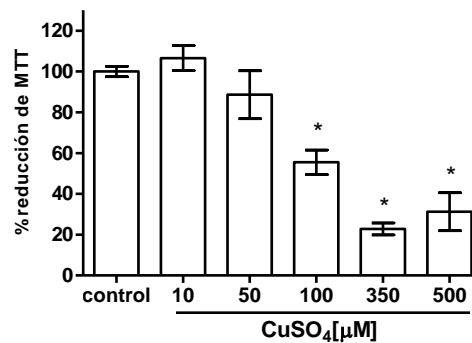


Fig. 9 Efecto de CuSO_4 sobre la producción de ERO (A), PL (B), actividad de LDH (C) y MTT (D) en rebanadas cerebrales de corteza de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 14 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

El daño celular además se evaluó a través de ioduro de propidio, en donde observamos que le CuSO_4 (350 μM) aumenta este marcador, confirmando el grado de daño celular inducido por este metal que observamos en el resto de los marcadores.

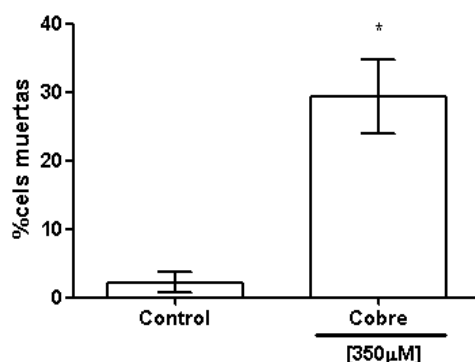


Fig. 10 Efecto de CuSO_4 sobre el ioduro de propidio en rebanadas cerebrales de corteza de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Efecto del CuSO_4 en la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina en rebanadas cerebrales de rata

Actividad de la IDO

Se midió la actividad de la IDO por medio de la producción de L-kyn. Lo que se observa es que el cobre es capaz de inhibir la actividad de la IDO a partir de la concentración de 250 μM (Fig. 11).

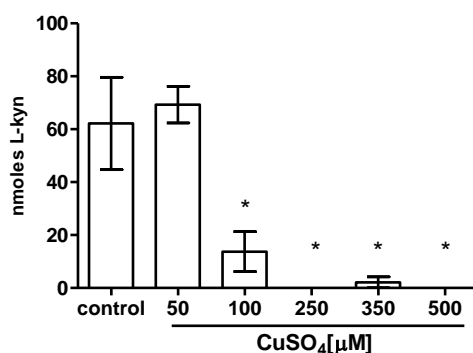


Fig. 11 Efecto de CuSO_4 sobre la actividad de la IDO en rebanadas cerebrales de corteza de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 4 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Actividad de las KAT's

La actividad de las KATs (figura 12) fueron evaluados después de la incubación de CuSO_4 en rebanadas corticales. Se observan que la actividad de las enzimas se ve inhibida por este metal, sugiriendo que la producción de KYNA encontrada no es dependiente de la actividad de las KATs.

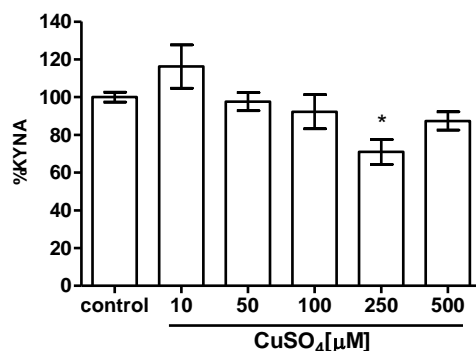


Fig. 12 Efecto de CuSO_4 sobre la actividad de la KAT en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 12 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

Actividad de la KMO

La actividad de la KMO (fig. 13) fueron evaluados después de la incubación de CuSO_4 en rebanadas corticales. Se observan que la actividad de la KMO aumenta significativamente después de incubar con CuSO_4 (a partir de $50\mu\text{M}$).

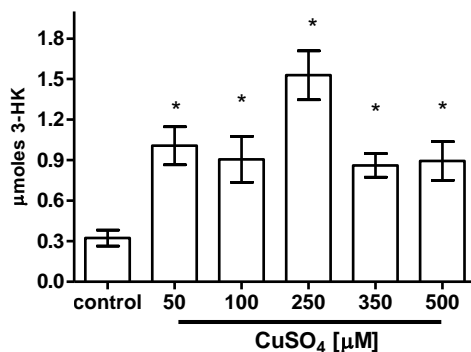


Fig. 13 Efecto de CuSO_4 sobre la actividad de la KMO en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

Efecto de la co-incubación de los metabolitos de la vía de la kinurenina con CuSO_4 en rebanadas de corteza de rata

En la figura 14 se observa que la combinación de CuSO_4 con 3-HK, el cual no tuvo una potenciación o atenuación en la funcionalidad celular ni en los marcadores de daño oxidativo. Por otra parte, el 3-HK tampoco tuvo efecto en el daño celular inducido por el plomo y el cual fue evaluado a través de ioduro de propidio.

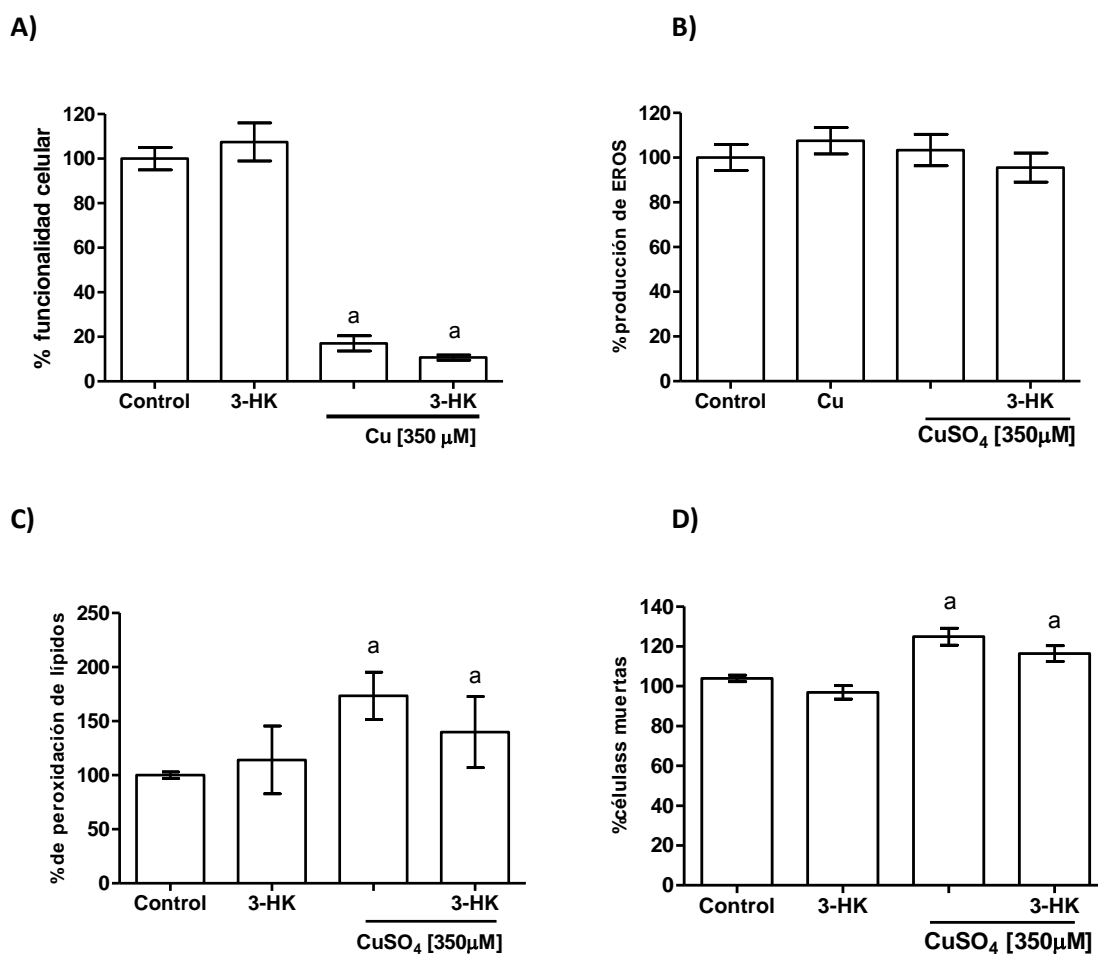
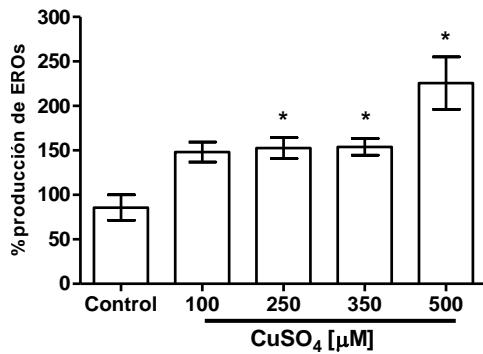


Fig. 14 Efecto de CuSO_4 en combinación de 3-HK sobre actividad de MTT (A), ERO (B), PL (C) y ioduro de propidio (D) en rebanadas cerebrales de corteza. Se presenta la media + S.E.M. de 9 experimentos por concentración. $p < 0.05$ (a) valores significativamente diferentes al control, se realizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

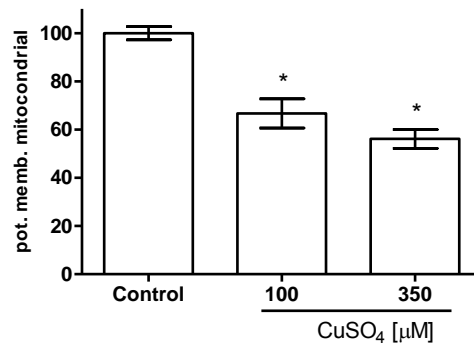
Efecto del CuSO₄ en astrocitos primarios de rata

La exposición de los cultivos de astrocitos primarios de rata a diferentes concentraciones de CuSO₄ (10, 50, 100, 250, 350 y 500 μM) durante 24 horas muestra un incremento en la producción de ERO (15A), así como una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (15B) y una reducción de MTT a formazán de manera concentración dependiente (figura 15C).

A)



B)



C)

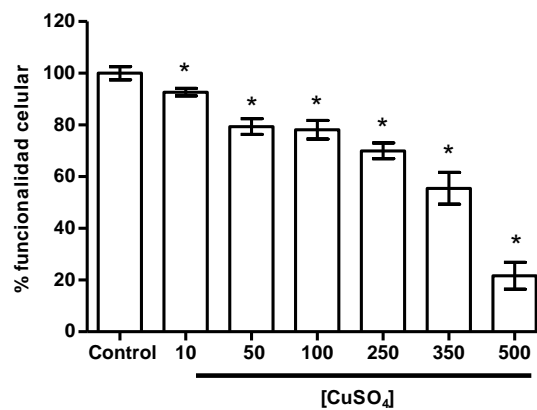


Fig. 15 Efecto de CuSO₄ sobre la producción de ERO (A), JC-1 (B) y la funcionalidad celular (C) de astrocitos primarios de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. *p<0.05 valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

Efecto del CuSO_4 en la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata

Efecto del CuSO_4 en la actividad de las KAT's en astrocitos primarios de rata

Después de la incubación del CuSO_4 se determinó la actividad de la kinurenina aminotransferasa. Como se puede observar en la figura 16 que la actividad enzimática de las KATs aumentó significativamente tras la incubación con este metal.

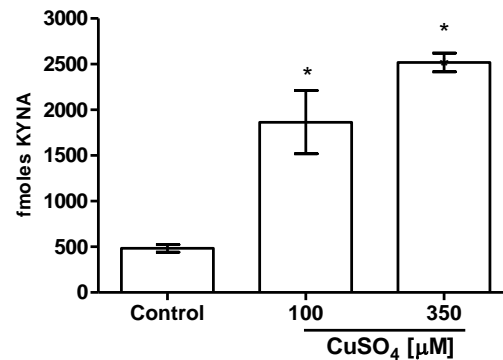
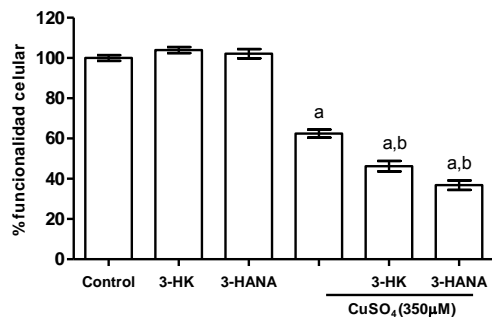


Fig. 16 Efecto de CuSO_4 sobre la actividad de KAT en astrocitos primarios de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 6 experimentos por concentración. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control, se realizó una t-student.

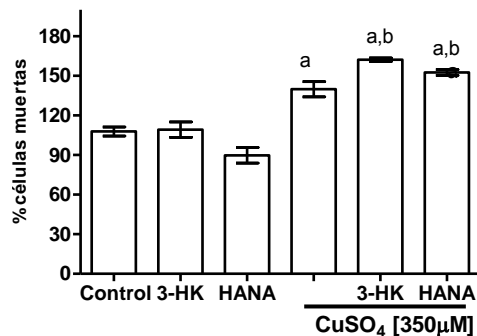
Efecto de la co-incubación de CuSO_4 con metabolitos de la vía de la kinurenina en astrocitos primarios de rata

Posteriormente se probó el efecto de $350 \mu\text{M}$ de CuSO_4 en combinación con los metabolitos de la vía de la kinurenina (3-HK y HANA ($100 \mu\text{M}$)), sobre la funcionalidad celular de astrocitos primarios de rata. En la figura 17 se muestra el efecto de la co-incubación de CuSO_4 con 3-HK y HANA sobre la funcionalidad celular. Se observa que el CuSO_4 disminuye la reducción de MTT alrededor de 45%, y que la co-incubación con las kinureninas disminuye aún más este marcador (70%), sugiriendo un efecto de potenciación.

A)



B)



C)

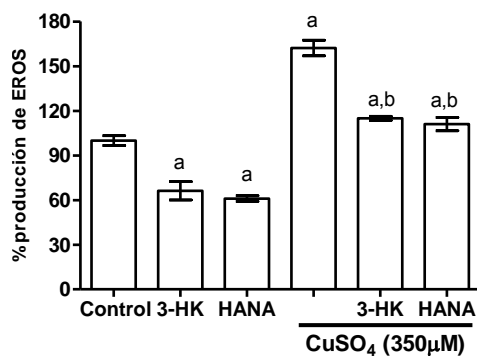


Fig.17 Efecto de la combinación de CuSO₄ con 3-HK y HANA sobre la funcionalidad celular de astrocitos (A), producción de ERO (B) y ioduro de propidio (C) en primarios de rata. Se presenta la media + S.E.M. de 8 experimentos por tratamiento. $p < 0.05$ (a) valores significativamente diferentes al control, (b) valores significativamente diferentes a 3-HK y (c) valores significativamente diferentes a HANA. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

DISCUSION

Con estos resultados podemos decir que el PbAc es capaz de incrementar la actividad de la enzima LDH, lo que se traduce en un mayor daño celular por parte de este compuesto en rebanadas corticales; cabe mencionar que el efecto del PbAc en rebanadas puede ser dependiente del daño oxidante, dado que uno de los marcadores de este evento fue modificado como lo es la lipoperoxidación, sin embargo esto no sucedió en la producción de ERO. Por otra parte PbAc tiene efectos diferentes sobre las enzimas que se pusieron a prueba: en el caso de la IDO, la actividad respecto al control fue más elevada en concentraciones de Pb de 250 μ M y 500 μ M. La razón podría ser que se favorezca la formación de la forma férrica del grupo hemo por especies reactivas como el superóxido y así se favorezca también la unión del triptofano al grupo hemo y esto lleve la ruptura del triptofano. (Werner, E.R. y Werner-Felmayer, 2007). En el caso de las KAT's, el plomo es capaz de incrementar su actividad. La actividad de la enzima, podría verse sobreactivada por el desbalance en el metabolismo energético de la célula que provoca el plomo, ya que es una enzima dependiente de moléculas energéticas como el piridoxal-5-fosfato o debido a alteraciones en vías de señalización celular (He et al., 2000; Wong et al., 2011; Reyes et al., 2014; Garza et al., 2005). Por otra parte, la actividad de la enzima KMO permanece sin cambios con las diferentes concentraciones de plomo.

En astrocitos la funcionalidad celular disminuye de manera concentración dependiente mientras que la actividad de la lactato deshidrogenasa incrementa, lo que se traduce en daño celular; en el caso de ERO encontramos que en presencia de diferentes concentraciones de plomo éstas incrementan, además de observar una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, concluyendo que el plomo es capaz de incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno y un daño en la funcionalidad mitocondrial. Por otra parte, la actividad de las KAT's disminuye, sugiriendo que los cambios provocados en el ambiente celular por plomo repercuten directamente en la producción de metabolitos como el ácido kinurénico. Adicionalmente, la co-incubación de metabolitos como 3-HK y HANA recuperan la reducción de MTT evocada por el plomo en astrocitos, es aquí donde 3-HK y HANA podrían funcionar como atrapadores de especies reactivas de oxígeno y así proteger a la célula del daño evocado por el plomo (Reyes-Ocampo et al., 2015).

El cobre provoca un daño celular ya que en rebanadas corticales es capaz de disminuir la funcionalidad celular e incrementar la cantidad de lípidos peroxidados, sin embargo, el marcador de ERO no presenta cambio alguno, pero si incrementa el número de células muertas. Cuando el CuSO_4 está en presencia de 3-HK y HANA en rebanadas corticales no existe alguna protección ni potenciación del daño provocado por el cobre en el marcador de reducción de MTT y el número de células muertas.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que el CuSO_4 tiene efecto sobre la modulación de la KAT, IDO y KMO. En el caso de la IDO, el cobre es capaz de inhibir su actividad desde concentraciones de 100 μ M en adelante, esto se puede deber a la estructura de la enzima y la necesidad de Cu(II) disponible para que se lleve a cabo la catálisis dentro de la enzima (O. Brady,

F., 1975). El cobre libre es capaz de generar ERO y radicales libres por medio de la reacción de Fenton (Rivera-Mancia et al., 2010), esto aunado a los resultados obtenidos sobre la alteración del estado redox celular, debido a la presencia de lípidos peroxidados y la alteración de otros marcadores como la disminución de la funcionalidad celular (reducción de MTT) e incremento de células muerta podríamos decir que el estado redox celular causado por la presencia del mismo cobre llevan a un ambiente en donde el funcionamiento de la enzima ya no se puede llevar a cabo; esto podría ser por la presencia de especies reactivas que alteren el sitio de unión del cobre en la enzima, por ejemplo el H_2O_2 el cual se ha reportado como un inhibidor de laIDO y esto es debido al daño al grupo hemo como a la estructura de la proteína (Geng, J. y Liu, A., 2013). Otra de las causas es que la misma presencia de especies reactivas eviten la formación del complejo O_2 -Trip-Fe(II) y así se vea afectada la ruptura del anillo del Trp (Geng, J. y Liu, A., 2013). El cobre en el caso de la actividad de las KATs disminuyó su actividad en las rebanadas. La actividad de KMO se vio incrementada en presencia de cobre, lo que nos sugiere que el cobre podría estar provocando más síntesis de ácido quinolínico por medio de la sobreactivación de esta enzima, además de que el cobre podría estar provocando una sobreactivación vía producción de especies reactivas, ya que esta enzima tiene como regulador positivo al O_2 (Amaral, M. et al., 2013; Reyes O., J. et al., 2014).

En astrocitos primarios de rata el cobre fue capaz de disminuir la funcionalidad celular, así como el potencial de membrana mitocondrial y un incremento en la producción de ERO. El cobre incrementó la actividad de las KATs, resultado que podría ser causado por la presencia de especies reactivas en ambiente celular.

Por otra parte, la co-incubación de cobre con metabolitos como 3-HK y 3-HANA llevó a la potenciación de marcadores como la disminución de la funcionalidad celular evocada por cobre y el incremento de células muertas en presencia de cobre y 3-HANA, esto podría explicarse por medio de un reporte hecho previamente en donde demuestran que 3-HK y 3-HANA son capaz de ser oxidados en presencia de cobre (Golstein, L., 2000).

Por último, debido a que los experimentos de estandarización con $FeSO_4$ no arrojaron ningún cambio en los marcadores probados, bajo nuestras condiciones y concentraciones, decidimos continuar viendo el efecto de plomo y cobre, los cuales dentro de la estandarización nos dieron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

- El plomo y el cobre son capaces de provocar daño celular de acuerdo a los cambios vistos en los marcadores de LDH, funcionalidad celular, peroxidación de lípidos y producción de especies reactivas del oxígeno.
- El plomo y el cobre modifican de diferente manera cada una de las enzimas de la vía de la kinurenina (IDO, KAT y KMO), esto depende de la preparación (rebanadas o astrocitos primarios) y concentración del metal evaluado.

- La co-incubación de metabolitos como 3-HK y 3-HANA tienen un efecto diferencial en presencia de cada uno de los metales.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la concentración de los demás metabolitos de la vía en presencia de metales como el cobre y el plomo.

- Evaluar la actividad de otras enzimas de la vía de la kinurenina en presencia de plomo y cobre.

- Evaluar el efecto de plomo y cobre en un sistema *in vivo*.

- Evaluar el efecto de plomo en un sistema vivo en donde se evalúe parámetros como la conducta y memoria para observar si la presencia del metal se correlacione con la alteración de metabolitos de la vía de la kinurenina.

BIBLIOGRAFÍA

Amaral, M., Levy, C., Heyes, D. J., Lafite, P., Outeiro, T.F., Giorgini, F. Leys, D. y Scrutton, N. S. (2013). "structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition". *Nature* 496(7445):382-385.

Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med* 10 Suppl: S18-25.

Arnal N., María J. Tacconi de Alaniz, Carlos Alberto Marra. (2012). "Cytotoxic effects of copper overload on human-derived lung and liver cells in cultura". *Biochimica et Biophysica Acta* 1820. 931–939

Arnal N., Lina Dominici, María J. Tacconi de Alaniz, Carlos Alberto Marra. (2014). "Copper-induced alterations in rat brain depends on route of overload and basal copper levels". *Nutrition* 30. 96–106

Atwood C.S., R.C. Scarpa, X. Huang, R.D. Moir, W.D. Jones, D.P. Fairlie, R.E. Tanzi, A.I. Bush. (2000). "Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1–42". *J. Neurochem.* (75) 1219–1233.

Ballatori N. (2002). "transport of toxic metals by molecular mimicry". *Environ. Health perspect.* 110 (supl5) 689-694.

Barnham K.J., F. Haeffner, G.D. Ciccotosto, C.C. Curtain, D. Tew, C. Mavros, K. Beyreuther, D. Carrington, C.L. Masters, R.A. Cherny, R. Cappai, A.I. Bush. (2004)." Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease beta-amyloid". *FASEB J.* (18) 1427–1429.

Berg D, M.B. Youdim. (2006). "Role of iron in neurodegenerative disorders". *Top. Magn. Reson. Imag.* 17. 5–17.

Bordelon, Y. M., M. F. Chesselet, D. Nelson, F. Welsh and M. Erecinska (1997). "Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum." *J Neurochem* 69(4): 1629-1639.

Browne S.E., A.C. Bowling, U. MacGarvey, M.J. Baik, S.C. Berger, M.M. Muqit, E.D. Bird, M.F. Beal. (1997). "Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia". *Ann. Neurol.* 41. 6464-653

Cater M.A., K.T. McInnes, Q.X. Li, I. Volitakis, F.S. La, J.F. Mercer, A.I. Bush. (2008) "Intracellular copper deficiency increases amyloid-beta secretion by diverse mechanisms" *Biochem. J.*(41)141–152.

Cheah J. H., S.F. Kim, L.D. Hester, K.W. Clancy, S.E. Patterson III, V. Papadopoulos, S.H. Snyder. (2006). "NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1". *Neuron* (51) 431–440.

Chen F, Ding M, Castranova V, Shi X. (2001) "Carcinogenic metals and NF- κ B activation". *Molecular and Cellular Biochemistry*. 222(1-2):159–171.

Coyle, J. T. and P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science* 262(5134): 689-695.

Demougeot C., C. Marie y A, Beley. (2000). "Importance of iron location in vitro-induced hidroxil radical production by brain slices". *Life sciences* 67. 399-410.

Dexter D.T., P. Jenner, A.H. Schapira, C.D. Marsden. (1992). "Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia". The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group, *Ann. Neurol.* 32 S94–100.

Dexter D.T., F.R. Wells, A.J. Lees, F. Agid, Y. Agid, P. Jenner, C.D. Marsden. (1989). "Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease". *J. Neurochem.* (52) 1830–1836.

Doreulee N. y Yanovsky Y. (1997). "Suppression of long-term potentiation in hippocampal slices by copper". *HIPPOCAMPUS* 7:666-669.

Fox J., Kama J., Lieberman G., Chopra R., Dorsey K., Chopra V., Volitakis I., Cherny R.A., Bush A.I., Hersch S. (2007). "Mechanisms of copper ion mediated Huntington's disease progression" *PLoS ONE* 2 (3) e334.

Fumero A., Y. 2013. "Caracterización del mejillón verde (*Perna viridis*) de la Bahía de Cienfuegos, como posible alimento para el consumo humano" Tesis. INSTITUTO DE NUTRICIÓN E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS. 83 pp.

Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. *ANALES Sis San Navarra*, Vol. 26, Suplemento 1. 141-153.

Flora SJS, Mittal M, Mehta A. (2008) "Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy". *Indian Journal of Medical Research* 128(4):501–523.

Flora SJS, Flora G, Saxena G. (2006) "Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning". In: Cascas SB, Sordo J, editors. *Lead Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impacts and Health Effects*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Publication pp. 158–228.

Flórez, J.. (2012). "Metales: toxicología y antídotos" en *Farmacología humana*. Flórez 3ª edición. 1007-1015.

Garza A, H. Chávez, R. vega y E. Soto. (2005). "Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo". *Salud mental*. Vol 28 No. 2. 48-58

Geng, J. y Liu, A. (2013). "Heme-dependent dioxygenases in tryptophan oxidation". *Archives of Biochemistry and Biophysics*

Goldstein, L. E., M. C. Leopold, X. Huang, C. S. Atwood, A. J. Saunders, M. Hartshorn, J. T. Lim, K. Y. Faget, J. A. Muffat, R. C. Scarpa, L. T. Chylack, Jr., E. F. Bowden, R. E. Tanzi and A. I. Bush (2000). "3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction." *Biochemistry* 39(24): 7266-7275.

Goldschmith A., C. Infante, J. Leiva, E. Motles y M. Alestini. (2005). "Interference of chronically ingested copper in long-term potentiation (LTP) of rat hippocampus. *Brain Research* 1056. 176-182.

Goshima, N., A. Wadano and K. Miura (1986). "3-Hydroxykynurenine as O₂•⁻ scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*." *Biochem Biophys Res Commun* 139(2): 666-672.

Gunnarson E., G. Axehult, G. Baturina, S. Zelenin, M. Zelenina y A. Aperia. (2005). "Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4". *Neuroscience* 136. 105-114.

He L., Poblenz A.T., Medrano C.J., Fox D.A. (2000). "Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol Chem.* 275 (16). 12175-12184.

Lancranjan I, Popescu HI, Găvănescu O, Klepsch I, Serbănescu M. (1975) "Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead". *Archives of Environmental Health* 30(8):396–401.

Lapin, I.P. (1980). "Experimental studies on kynurenine as neuroactive tryptophan metabolites: past, present and future" *Trends Pharmacol Sci* 370(1): 410–413.

Leipnitz, G., C. Schumacher, K. B. Dalcin, K. Scussiato, A. Solano, C. Funchal, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, C. M. Wannmacher, A. Latini and M. Wajner (2007). "In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain." *Neurochem Int* 50(1): 83-94.

Leonard SS, Harris GK, Shi X. (2004). "Metal-induced oxidative stress and signal transduction". *Free Radical Biology and Medicine.* 37(12):1921–1942.

Lockith G. (1993) "Blood lead levels in children". *Canadian Medical Association Journal.* 149:139–142.

Lugo-Huitron, R., T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muniz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverri, D. Silva-Adaya, P. D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzon, E. Ortiz-Islas, T. Lopez, E. Garcia, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaria and V. P. La Cruz (2011). "On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress." *Neurotoxicol Teratol* 33(5): 538-547.

Madsen, E., J.D. Gitlin. (2007). "Copper and iron disorders of the brain" *Annu. Rev. Neurosci.* 30 317–337.

Matin, A., Streete, I.M., Jamie I.M., Truscott R.J. y Jamie J.F. "A fluorescence-based assay for indoleamine 2,3-dioxygenase". *Anal Biochem.* 2006 Feb 1;349(1):96-102.

Mercer, J. F.B. (2001). "The molecular basis of copper-transport diseases". *TRENDS in molecular medicine.* Vol. 7 No. 2. 64-69.

Moroni, F. (1999). "Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites." *Eur J Pharmacol* 375(1-3): 87-100.

Moroni, F., G. Lombardi, G. Moneti and C. Aldinio (1984). "The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process." *Neurosci Lett* 47(1): 51-55.

Nakagami, Y., H. Saito and H. Katsuki (1996). "3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum in vivo." *Jpn J Pharmacol* 71(2): 183-186.

Nicholas J.C. King and Shane R.Thomas (2007). "Molecules in focus: Indolamine 2,3-dioxygenase" *The Int Jou of Bioch & Cell Biology* 39: 2167-2172.

O. Brady, F. (1975). "Inhibition of rabbit intestinal Indolamine 2,3-Dioxygenase by copper chelators". *Febs Let* 57(3): 237-240.

O. Brady, F. (1975). "Tryptophan 2,3-Dioxygenase: A review of the roles of the heme and copper cofactors in catalysis". *Bioinorg chemis* 5:167-182.

Okuda, S., N. Nishiyama, H. Saito and H. Katsuki (1996). "Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12553-12558.

Okuda, S., N. Nishiyama, H. Saito and H. Katsuki (1998). "3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity." *J Neurochem* 70(1): 299-307.

Okuno, E. and R. Kido (1991). "Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues." *Adv Exp Med Biol* 294: 167-176.

Okuno, E., M. Nakamura and R. Schwarcz (1991). "Two kynurenine aminotransferases in human brain." *Brain Res* 542(2): 307-312.

Oubidar M., Micheline Boquillon, Christine Marie, Christine Bouvier, Alain Beley, and Jean Bralet. (1996). "Effect of intracellular iron loading on lipid peroxidation of brain slices". *Free radical biology & medicine*, ol. 21. No. 6, pp. 763-769.

Patra R.C., D. Swarup y S.K. Dwivedi. (2001). "Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-metionene on lead induced oxidative stresses to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 162. 81-88.

Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1992). "Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease." *Neurosci Lett* 144(1-2): 199-201.

Peña M.M., J. Lee, D.J. Thiele. (1999). "A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution" *J. Nutr.* 129, 1251–1260.

Perez-De La Cruz, V., M. Konigsberg, J. Pedraza-Chaverri, N. Herrera-Mundo, M. Diaz-Munoz, J. Moran, T. Fortoul-van der Goes, A. Rondan-Zarate, P. D. Maldonado, S. F. Ali and A. Santamaria (2008). "Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic /energetic deficit synergic model in rats." *Eur J Neurosci* 27(5): 1075-1085.

Phillips, R. S. (2013). "Structure and mechanism of kynureninase". *Arc of Bioc and Biop*
Quiang, H., Maofa, Z., Shuangshuang, Y., Chunxiang, K., Cunjing Y. y Qing Y. (2011). "Structure-activity relationship and enzyme kinetic studies on 4-aryl-1H-1,2,3-triazoles as indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors" *European Jour of Med Chem* 46:5680-5687.

Quagliariello, E., S. Papa, G. Budillon and C. Saccone (1964). "Effect of 3-hydroxyanthranilic on a mitochondrial respiratory system." *Bioch J.* 91 (137): 137-146.

Reyes O., J., Lugo-Huitrón, R., Gonzáles-Esquivel, D., Ugalde Muñiz, P., Jiménez-Anguiano, A., Pineda, B., Pedraza-Chaverri, J., Ríos, C. y Pérez de la Cruz, V. (2014). "Kynurenines with neuroactive and redox properties: relevance to aging and brain diseases. *Oxid Med and Cel Long* 22pg

Reyes-Ocampo J, Ramírez-Ortega D, Vázquez Cervantes GI, Pineda B, Montes de Oca Balderas P, González-Esquivel D, Sánchez-Chapul L, Lugo-Huitrón R, Silva-Adaya D, Ríos C, Jiménez-Anguiano A, Pérez-de la Cruz V. (2015). "Mitochondrial dysfunction related to cell damage induced by 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid: Non-dependent-effect of early reactive oxygen species production" *Neurotoxicology.* Aug 5;50:81-91.

Rivera-Mancía, S.; I. Pérez-Neri; Camilo Ríos; L. Tristán-López; L. Rivera-Espinosa, S. Montes. (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions.* 186, 184-199.

Rikio S. and Isao I. (1969). "The purification and properties of formamidase from rat liver". *Biochimica et Biophysica* 198:324-331.

Rodríguez M, A. (2009). Expression profiling of novel Iron-related genes in mouse models of iron overload. *Academic Dissertation, Tesis.*

Ruff HA, Markowitz ME, Bijur PE, Rosen JF. (1996) "Relationships among blood lead levels, iron deficiency, and cognitive development in two-year-old children". *Environmental Health Perspectives* 104(2):180–185

Rush T., J. Hjelmhaug, D. Lobner. (2009). "Effects of chelators on mercury, iron, and lead neurotoxicity in cortical culture". *NeuroToxicology* 30. 47–51

Selva, R., C. G. Ríos, N. G. Crisostomo, E. F. Garcidueñas, D. F. Briseño, L. Navarro and E. R. Martínez (2011). "Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease, Neurodegenerative Diseases" - Processes, Prevention, Protection and Monitoring, Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed.), ISBN: 978-953-307-485-6, InTech, DOI: 10.5772/28857. Available from: <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases-processes-prevention-protection-and-monitoring/oxidative-stress-and-neurodegenerative-disease>.

Shukla, V., S. K. Mishra and H. C. Pant (2011). "Oxidative stress in neurodegeneration." *Adv Pharmacol Sci* 572-634.

Smithdt, W., Guidetti, P. Okuno, E. y Schwarcz, R. (1993) "Characterization of human brain kynurenine aminotransferases using 3H kynurenine as a substrate. *Neuroscience* 55(1): 177-184.

Smythies, J. (1999). "The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationships in health and disease: a review-discussion." *Neurotox Res* 1(1): 27-39.

Stone, T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." *Pharmacol Rev* 45(3): 309-379.

Stone, T. W. (2001). "Endogenous neurotoxins from tryptophan." *Toxicol* 39(1): 61-73.

Tiffany-Castiglioni, T.; Sandra-Hong, Yongchang Quian. (2011). "Copper handling by astrocytes: Insights into neurodegenerative diseases" *Int. J. Devl. Neuroscience*. (29) 811-818.

Vazquez, S. (2001). "Human lens protein modification : the role of kynurenine and 3 HK" Doctor of philosophy thesis. University of Wollongong. Dept. of chemistry.

Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress". *Current Medicinal Chemistry* 12(10):1161–1208.

Wadano, A., Takenaka, Y., Matumoto, M. (1993). "3-Hydroxykynurenine as a radical scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*" *23(8)*: 915-925.

Watt N. T. y Nigel M. Cooper. (2001). "The response of neurones and glial cells to elevated copper". *Brain Research Bulletin*, Vol. 55, No. 2, pp. 219–224.

Watanabe, Y., R. Yoshida, M. Sono and O. Hayaishi (1981). "Immunohistochemical localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in the argyrophilic cells of rabbit duodenum and thyroid gland." *J Histochem Cytochem* 29(5): 623-632.

Werner, E.R. y Werner-Felmayer, G. (2007). "Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma treated cells: Utilization of oxygen rather than superoxide" *Curr Drug Metab* 8(3): 201-203.

Wong, J., Ray, W. J. and Kornilovva, A. Y. (2011). "Development of a microplate fluorescence assay for kynurenine aminotransferase. *Analytical Biochem* 409:183-188.

Yuhong, D., William, E. D. y Orlen R. B. (2000). "Comparative effects of oxygen on Indolamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophan 2.3-Dioxygenase of the Kynurenine pathway". *Free Radical Biology & Medicine* 28(4):615-624.

Zwilling D., Huang S.Y., Sathyaikumar K.V., Notarangelo F.M., Guidetti P., Wu H.Q., Lee J., Truong J., Andrews-Zwilling Y., Hsieh E.W., Louie J.Y., Wu T., Scearce-Levie K., Patrick C., Adame A., Giorgini F., Moussaoui S., Laue G., Rassoulpour A., Flik G., Huang Y., Muchowski J.M., Masliah E., Schwarcz R., Muchowski P.J. "Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration". *Cell*. 2011 Jun 10;145(6):863-74

PUBLICACIONES

Chapter 5 Role of Kynurenine Pathway in Aging

Daniela Ramirez Ortega, Dinora González Esquivel, Benjamín Pineda,
Camilo Ríos, and Verónica Pérez de la Cruz

Abstract Aging is a degenerative process that affects all living organisms and is characterized by physiological and functional changes that drives to numerous aging-related disorders contributing to death. Cellular changes during the aging process involve oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction, and cognitive and immune response decline. In this context, changes in tryptophan metabolism are also found. Tryptophan is an essential amino acid required for the synthesis of proteins, and it is mainly metabolized via the kynurenine pathway generating several metabolites with neuroactive and/or redox properties. Due to kynurenine pathway, metabolites have been related with aging and some aging-related diseases; we review here the alteration in kynurenine pathway components during aging and study the relationship between these metabolites and other factors present during the aging process, with the goal of exploring their therapeutic value, as targets or biomarkers of different age diseases or aging states.

Keywords Aging • Kynurenine pathway • Kynurenic acid • Oxidative stress

List of Abbreviations

| | |
|--------|--|
| ACMSD | 2-Amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase |
| AMO | Anthranilate 3-monooxygenase |
| CNS | Central nervous system |
| CSF | Cerebrospinal fluid |
| 3-HANA | 3-Hydroxyanthranilic acid |
| 3-HDO | 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase |
| 3-HK | 3-Hydroxykynurenine |

D. Ramirez Ortega • D. González Esquivel • C. Ríos • V. Pérez de la Cruz (✉)
Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel
Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, México DF, 14269, Mexico
e-mail: veped@yahoo.com.mx

B. Pineda
Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel
Velasco Suárez, México DF 14269, Mexico

© Springer International Publishing Switzerland 2015
S. Mittal (ed.), *Targeting the Broadly Pathogenic Kynurenine Pathway*,
DOI 10.1007/978-3-319-11870-3_5

63

| | |
|------------------|---|
| IDO | Indoleamine 2,3-dioxygenase |
| IFN | Interferon |
| KYNA | Kynurenic acid |
| KATs | Kynurenine aminotransferases |
| KMO | Kynurenine 3-monooxygenase |
| KP | Kynurenine pathway |
| L-KYN | L-Kynurenine |
| NAD ⁺ | Nicotinamide adenine dinucleotide |
| NMDAr | N-methyl-D-aspartate receptor |
| PIC | Picolinic acid |
| QUIN | Quinolinic acid |
| QPRT | Quinolinic acid phosphoribosyltransferase |
| ROS | Reactive oxygen species |
| Trp | Tryptophan |
| TDO | Tryptophan 2,3-dioxygenase |
| XA | Xanthurenic acid |

Introduction

Tryptophan

In humans, tryptophan (Trp) is an essential amino acid that can only be taken up through diet, and it enters in cells by active transport. Around <1 % of Trp is used for protein synthesis, and it is also a precursor of biomolecules with specialized functions mainly through two major metabolic pathways: (1) the methoxyindole pathway, which leads to the formation of serotonin (implicated in regulating mood, appetite, and reproduction) and, subsequently, melatonin (implicated in circadian rhythm) [1], and (2) the kynurenine pathway (KP), which metabolizes about 95 % of Trp and produces metabolites with neurochemical and redox properties leading to the NAD⁺ as a final product. The cellular environment can affect the regulation of Trp metabolism leading to changes in the physiological and behavioral process that can be related with aging and aging-related diseases. In this context, the study of the KP is key to designing strategies with potential to prevent and treat aging-related diseases, improve health, and extend lifespan.

Kynurenine Pathway

In mammals, Trp is mainly metabolized via the kynurenine pathway (KP) (Fig. 5.1), where tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) catalyze the first step, which consists in the oxidative opening of the indole ring.

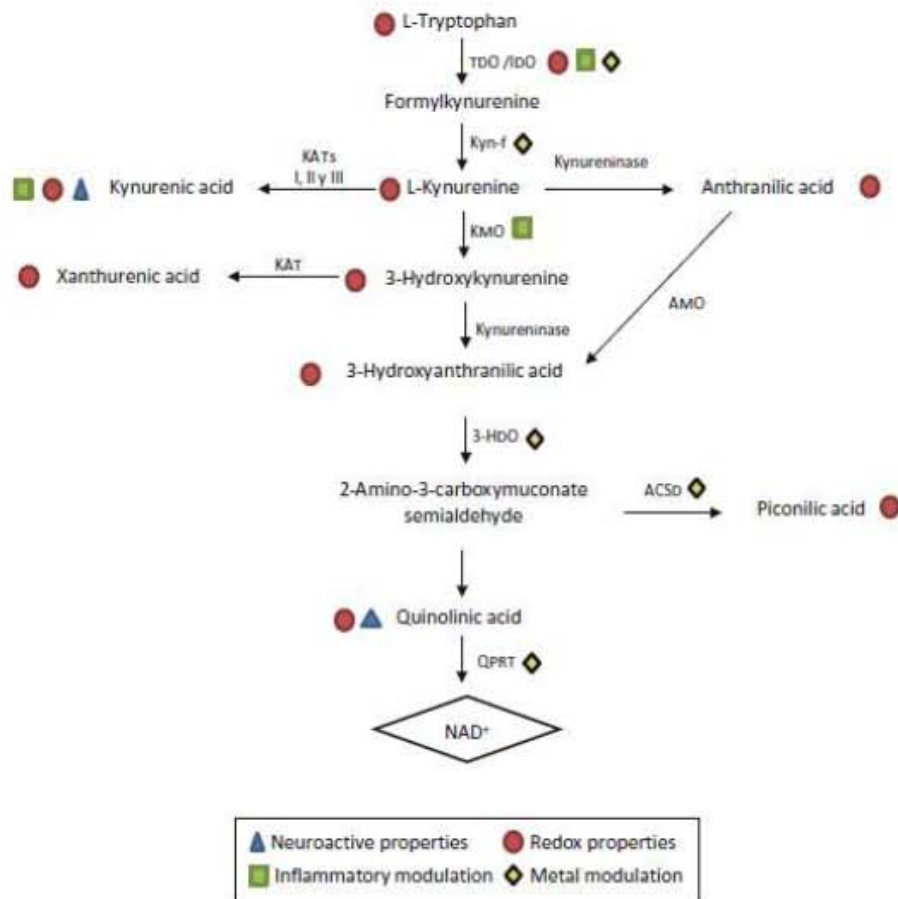


Fig. 5.1 The kynurenine pathway. The *symbols* show the modulation and properties found until now for each metabolite or enzyme. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), kynurenine formamidase (Kyn-f), kynurenine aminotransferases I, II, and III (KATs I, II, and III), kynureninase (Kynu), kynurenine 3-monooxygenase (KMO), anthranilate 3-monooxygenase (AMO), 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (3-HDO), 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase (ACMSD), quinolinic acid phosphoribosyltransferase (QPRT)

These enzymes are expressed in different tissues, and their expression is induced upon exposure to different stimuli. TDO is expressed mainly in the liver and its expression is induced by Trp itself or by stress hormones. In contrast, IDO is found in most mammalian cells, including macrophages and cells of the central nervous system (CNS). IDO is induced by the pro-inflammatory cytokine interferon (IFN)- γ and other immune stimulants, including lipopolysaccharide [2, 3]. *N*-Formylkynurenine is the product of TDO and IDO and is rapidly degraded to *l*-kynurenine (*l*-KYN) by kynurenine formamidase.

L-KYN is a key metabolite in KP because it can be a substrate for different enzymes: (1) kynurenine aminotransferases (KATs) to produce kynurenic acid (KYNA), the only endogenous antagonist of *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR); (2) kynureninase to produce anthranilic acid, which then is taken by anthranilate 3-monooxygenase (AMO) to produce 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA); and (3) kynurenine 3-monooxygenase (KMO) to produce 3-hydroxykynurenine (3-HK). 3-HK can be metabolized to xanthurenic acid (XA) through KATs or can be also metabolized to 3-HANA by kynureninase. 3-HANA is subsequently converted to 2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde by 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (3-HDO). The intermediate product is taken by 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase (ACMSD) to form picolinic acid (PIC) or also can suffer nonenzymatic cyclization (spontaneous) to produce quinolinic acid (QUIN). QUIN is known as excitotoxin due to its NMDAR agonism. Finally, QUIN is metabolized through quinolinic acid phosphoribosyl-transferase (QPRT) to NAD⁺.

These KP metabolites possess different properties, and their imbalance can have impact in aging or aging-related diseases. The most studied metabolites are KYNA, which higher levels are related with cognitive deficit attributable to its capability to block $\alpha 7$ nicotine acetylcholine receptor; higher levels of QUIN are related with excitotoxicity and oxidative stress, while 3-HK and 3-HANA are considered pro-oxidant agents and can induce cell death. 3-HK has also been involved in several neurodegenerative disorders [4].

Aging and Oxidative Stress

Human aging is a multifactorial process involving genetic, environmental, epigenetic, and lifestyle factors and is characterized by progressive deterioration in physiological functions and metabolic processes. One consequence of aging is an increased incidence of aging-related diseases, such as cancer and neurodegenerative disorders. Recent reports have shown that the activity of antioxidant enzymes decreases and oxidative markers are elevated with aging in various organs [5, 6], particularly in the brain, making some cerebral areas more susceptible to the oxidative damage [7]. The brain is highly vulnerable to reactive oxygen species (ROS) effects, as it contains high concentrations of polyunsaturated fatty acids, which are the target of lipid peroxidation; also the brain does not possess an efficient antioxidant system as compared to other organs. The damage to other systems, such as glutamatergic, cholinergic, and catecholaminergic pathways, increases the organs' susceptibility to oxidative damage.

Additionally, the increase in ROS formation is accompanied by a loss of thiol groups, Trp degradation, and increased lipid peroxidation during aging [8]. There are a lot of damaged macromolecules, failure of protein repair, and maintenance systems which all are indicators of aging at a cellular level. Under certain condi-

tions, imbalance of ROS levels or disturbances in ROS signaling drives to pathological states like cardiovascular diseases, inflammation, cancer, and dementias [9].

On the other hand, aging also is characterized by inflammation. In fact, levels of inflammatory mediators typically increase with the age even in the absence of acute infection or another physiologic stress [10]. In this line, IFN- γ and TNF- α production and higher oxide nitric levels have been observed in senescence-accelerated mice [11]. Another consequence of aging is a decline in immune response, affecting the rate at which naive B and T cells are produced as well as the composition and quality of the mature lymphocyte pool [12]. In this context, T cell populations show poor response, which is one of the main changes that happen in immunosenescence, as has been measured in aged subjects. The changes in oxidative markers as well as the inflammatory parameters and the decline in immune function found during aging can be related with the KP metabolite alterations, due to the fact that these kynurenines possess redox and neuroactive properties and can be modulated by the inflammatory response. Until now, the main question is whether the general cellular status in aging is modified by the levels of kynurenines or if the KP metabolites are directly implicated in the cellular changes observed during the aging process. The exact mechanisms which modify these factors with aging have not been fully understood; however, we can assume that all of them are closely related in some way.

Relationship Between Aging and the Kynurenine Pathway

As was mentioned before, KP metabolites possess redox properties, and KP enzymes are also modulated by the environment (free radicals, antioxidants, and pro-inflammatory cytokines). Alteration in the levels of KP metabolites in aging suggests a complicated stage that provokes cells more vulnerable to damage, which is closely related with cognitive impairment, inflammation, oxidative stress, immune response decline, and events that can lead to aging-related diseases. This implies that Trp metabolites could be potent regulators of aging and aging-related diseases, offering new targets for lifespan intervention.

Different studies in various organisms have implicated Trp metabolism as a powerful regulator of aging and aging-related diseases (Table 5.1). For example, considering that IDO is involved in immune response and also suppresses T cell activity, Pertovaara et al. [20] measured the KYN/Trp ratio (Trp degradation rate, IDO activity) in a nonagenarian population finding that it was higher in older people than healthy controls and also was able to predict mortality in these individuals. They postulate that IDO activity reflects the fact that T cell response declines with age, although Trp levels did not change in both groups. In line with this, the authors also noted that both neopterin levels (induced by IFN- γ via IDO) as well as the KYN/Trp ratio increase in older people [11]. Similarly, the ratio of L-KYN/Trp was also increased in aged rats (28–32 months) compared with mature rats (4–6 months) [12].

Table 5.1 Changes of KP components found during the aging in diverse species and tissues

| Metabolite or enzyme | Species | Tissue or sample | Modulation in aging | Reference |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------|--|-----------|
| Trp | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↓ ↓ ↓ | [13] |
| | Male Wistar rats | Lenses | ↑ 7–10 days ↓ from 45 days and older | [14] |
| | Sprague-Dawley rats | Brain | ↑ from prenatal to birth ↓ from birth to P4 | [15] |
| TDO | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↓ ↓ ↓ | [13] |
| | Sprague-Dawley rats | Liver | ↓ | [16] |
| | Human | Serum | ↑ | [17] |
| | Male Mill Hill hooded rats | Liver | ↓ 6–18 months ↑ 24 months | [18] |
| IDO | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↑ ↓ ↓ | [13] |
| | Sprague-Dawley rats | Small intestine | ↓ | [16] |
| | Primiparous Sprague-Dawley rats | Brain | = pre- and postnatal | [19] |
| | Humans | Blood | ↑ | [20] |
| KYN | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↑ ↓ 12 months = 24 months ↓ 12 months ↑ 24 months | [13] |
| | Humans | Lenses | ↓ | [21] |
| | Male Wistar rats | Lenses | ↑ from 7 to 60 days ↓ 6 months and older | [14] |
| | Human | CSF | ↑ | [22] |
| | Sprague-Dawley rats | Brain | ↓ from prenatal to P4 | [15] |
| AA | Primiparous Sprague-Dawley rats | Brain | ↓ from prenatal to birth ↑ one postnatal week ↓ thereafter | [19] |
| KAT | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↑ = ↑ | [13] |
| | Sprague-Dawley rats | Liver Kidney | = ↑ | [16] |
| | Sprague-Dawley rat | Brain | ↑ | [23] |

(continued)

Table 5.1 (continued)

| Metabolite or enzyme | Species | Tissue or sample | Modulation in aging | Reference |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------|--|-----------|
| KYNA | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↑ = ↑ | [13] |
| | Humans | CSF Serum | ↑ = | [22, 24] |
| | Merino/Border Leicester cross sheep | CSF | ↑ | [25] |
| | Brown Norway rats | Retina | ↑ from E20 to P0 ↓ from second week postnatal to 12 months | [26] |
| | White Leghorn chickens | Retina | ↓ from E12 to birth and thereafter | [26] |
| | Male Sprague-Dawley rats | Brain (regions) | ↑ | [27, 28] |
| | Primiparous Sprague-Dawley rats | Brain | ↓ from E15 to E20 ↑ E21 ↓ from birth to P7 ↑ after P7 | [15, 19] |
| | Baboons (<i>Papio</i> sp.) | Cortex | ↓ | [15] |
| | Syrian hamsters | Plasma | = | [29] |
| | Male Sprague-Dawley rats | Liver | = | [28] |
| KMO | Sprague-Dawley rats | Liver Kidney | ↓ ↓ | [16] |
| Kynu | Sprague-Dawley rats | Liver Kidney | ↓ at 12 months ↑ at 18 months | [16] |
| 3-HDO | Sprague-Dawley rats | Liver Kidney | ↑ vs. 1 week ↑ vs. 1 week | [16] |
| QUIN | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↑ ↑ ↓ 12 months = at 24 months | [13] |
| | Male Wistar rats | Cortex brain | ↑ 3 days to 3 months | [30] |
| | Primiparous Sprague-Dawley rats | Brain | ↑ at birth vs. prenatal ↓ postnatal period | [19] |
| ACSMO | Sprague-Dawley rats | Liver | ↑ vs. 1 week No changes between 3, 12, and 18 months | [16] |
| | | Kidney | ↑ vs. 1 week ↓ at 18 months vs. 12 months | |

(continued)

Table 5.1 (continued)

| Metabolite or enzyme | Species | Tissue or sample | Modulation in aging | Reference |
|----------------------|-------------------|--------------------------|---|-----------|
| PIC | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↑ ↑ ↓ 12 months = at 24 months | [13] |
| | Humans | CSF | ↑ | [31] |
| QPRT | Female Wistar rat | Brain Liver Kidney | ↓ ↓ ↑ | [13] |

Abbreviations: Trp Tryptophan, TDO tryptophan 2,3-dioxygenase, IDO indoleamine 2,3-dioxygenase, KYN L-kynurenine, AA anthranilic acid, KAT kynurenine aminotransferase, KYNA kynurenic acid, KMO kynurenine 3-monooxygenase, Kynu kynureninase, 3-HDO 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, QUIN quinolinic acid, ACMSD 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase, PIC picolinic acid, QPRT quinolinic acid phosphoribosyltransferase

In other studies, it was found that depletion or inactivation of TDO in *C. elegans* or in flies resulted in increased lifespan [32, 33]. Moreover, it was observed that through the regulation of α -synuclein, amyloid- β , and polyglutamine proteins, the Trp levels are increased, suggesting that TDO2 could be a metabolic regulator of age pathologies and lifespan independent of kynurenines [32]. Other interesting findings observed in *C. elegans* were their gut granules containing anthranilic acid glucosyl ester which seems to serve as a marker for organism death; however, it is still under study whether there is relation with aging [34].

Braidy et al. [13] examined the KP metabolites and enzymes in the brain, liver, and kidney of female Wistar rats during aging. They found that Trp levels and TDO activity decreased in all tissues with age. In contrast, brain IDO activity increased with age. In this context, Mazarei et al. [35] studied IDO1 expression patterns during mouse brain development (9 days postnatal, 3 months, and 12 months) in the striatum, cortex, hippocampus, and cerebellum and found that IDO1 was significantly elevated in the striatum at all the time points compared with the other regions tested; the cortex was higher compared to the hippocampus, and there was no expression in the cerebellum. IDO2 exhibited a similar expression pattern as IDO1, being enriched in the striatum with no expression detectable in the cerebellum at 3 months of age. TDO2 expression was exclusive to the cerebellum. According to this, there is evidence that shows that depletion of TDO2 extends lifespan in *C. elegans* [32]. Additionally, this study also showed that KYNA, AA, XA, 3-HK, PIC, QUIN, and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HA) levels decreased in the striatum at 12 months compared with 3-month-old mice, while 3-HANA and serotonin increased in the striatum of older mice. In the cerebellum, AA, 3-HK, 3-HANA, PIC, serotonin, and 5-HA levels decreased, while KYN, XA, and NAD⁺ levels were

increased in 12-month-old mice compared with the cerebellum from 3-month-old animals.

Nevertheless, Braidy et al. [13] also found that KYN, KYNA, PIC, and QUIN levels increased with age in the rat brain, which can be related with the increase in IDO expression and activity as well as the inflammatory activity and cytokine activation during aging. In another study, PIC levels were determined in the CSF of patients with or without CNS disease. A linear correlation was found between CSF PIC concentration and the age of patients in both the disease and control populations [31]. These findings are consistent with previous studies that demonstrated an age-associated elevation in ACMSD activity in rat kidney [16]. Therefore, the increase in ACMSD activity could have the effect of reducing the biosynthesis of nicotinic acid and NAD⁺ in aging which could also cause impairment of cell function, leading to cell death.

Comai et al. [16] showed the correlation between some KP enzymes activities and age in the liver, kidney, and small intestine of male Sprague-Dawley rats. First, TDO enzyme activity decreased significantly with age progression in liver homogenates as well as KMO and kynureninase activity decreased both rat liver and kidneys. However, kynurenine-oxoglutarate transaminase, 3-HDO, and ACMSD activities increased with age in rat kidney [16].

Braidy et al. [13] also found that QUIN levels increased during aging in the liver and brain of female Wistar rats which can be correlated with the decrease in QPRT activity in the same samples, suggesting a decrease in NAD⁺ levels. Similar findings were reported by Moroni et al. [30] who noted an increase in QUIN levels in rat brain cortex with age.

Age-dependent changes of KYNA were previously studied in male rats of different ages by Moroni et al. [27]. The brain concentration of KYNA was extremely low during the first week of life, increased at 3 months and furthermore at 18 months of age. This effect in KYNA levels can be related with a previous study done by Baran and Schwarcz [23], in which KAT activity increased in all brain areas (but not in the liver) in rats between 3 days and 3 months postnatal. KAT activity increased in the parietal cortex 34-fold during the observation period, whereas enzyme activity in the cerebellum and substantia nigra increased only three- to five-fold over the same time interval. Between 3 and 24 months of age, the changes in KAT were particularly pronounced in the cortex and in the striatum, where enzyme activity increased three-fold during the period studied. KYNA production was significantly enhanced in the cortex and hippocampus of old animals [28]. In accordance with these results, Gramsbergen et al. [28] showed increased KAT levels between 3 and 24 months of age in different rat brain regions, mainly in the cortex and in the striatum, where enzyme activity increased three-fold during the period studied. It could be possible that the increased KYNA levels in aging confer to the brain resistance to neurotoxic damage since striatal injection of QUIN in old rats showed reduced susceptibility to toxicity of QUIN [36].

In humans, Heyes et al. [22] observed higher CSF levels of KYNA and KYN in older control subjects. Similarly, KYNA levels were evaluated in the CSF and serum in a group of human subjects without detectable neurological disease with a range of age between 25 and 74 years. Subjects under 50 years of age showed lower KYNA levels in CSF compared with subjects over 50 years (around 2.86 fmol/ μ L and 4.09 fmol/ μ L, respectively), while no differences on KYNA levels were found in the serum. The increase in KYNA levels was not related with KAT-I or KAT-II activities. In the same samples, KYNA levels were correlated with IgG and β_2 -microglobulin levels (a marker of activation of immune cells) [24]. Elevated KYNA metabolism may be involved in the hypofunction of the glutamatergic and/or nicotinic cholinergic neurotransmission in the CNS of aging humans. Experimental studies show that reductions in hippocampal KYNA constitute an effective strategy for cognitive improvement [37]. This approach might be especially useful in the treatment of cognitive impairment associated with increased brain KYNA levels as in aging.

Miaztal et al. [38] infused QUIN intracerebrally in rats for 2 weeks observing deficits in memory which resembles the cognitive impairment observed in aging. This observation was accompanied by neuronal loss from the forebrain. These findings are in accordance with results found by Moroni and colleagues who observed increased kynurenines levels in the CSF and brain in older animals suggesting that the metabolites are involved in the aging process [27, 30]. Different glycine-site antagonists of NMDAr (e.g., KYNA) have also been administered in rats and can result in both impaired working memory [39] and improved recognition memory [40].

Conclusion

In the aging process, KP metabolism shows characteristic patterns of changes throughout the lifespan, which has the capacity to impact cellular functions either by their own properties or by the NAD⁺ availability. Modulation in KP metabolism could be considered a target to alter or minimize age-associated cellular degenerative changes. Furthermore, better understanding of the involvement of KP metabolism in aging may help design additional strategies with the potential to improve the aging process. Other possibilities would be the use of KP metabolites as biomarkers at different levels, in peripheral fluids, and at central levels, in order to prevent or detect some diseases or imbalances between them. It would be necessary to begin in different populations and different diseases in order to count with level ranges.

Acknowledgments This work was supported by CONACYT Grant 183867 and ISN CAEN Award 2014/2015. Daniela Ramirez Ortega is a scholarship holder from CONACYT (Scholarship 308054). The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry*. 1998;44(3):151–62.
2. Yoshida R, Urade Y, Nakata K, Watanabe Y, Hayaishi O. Specific induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by bacterial lipopolysaccharide in the mouse lung. *Arch Biochem Biophys*. 1981;212(2):629–37.
3. Hayaishi O, Yoshida R. Specific induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by bacterial lipopolysaccharide. *Ciba Found Symp*. 1978;65:199–203.
4. Oxenkrug GF. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1199:1–14.
5. Gomi F, Matsuo M. Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1998;53(3):B161–7.
6. Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(9):1477–84.
7. Hussain AM, Mitra AK. Effect of reactive oxygen species on the metabolism of tryptophan in rat brain: influence of age. *Mol Cell Biochem*. 2004;258(1–2):145–53.
8. Kuka S, Tatarkova Z, Racay P, Lehotsky J, Dobrota D, Kaplan P. Effect of aging on formation of reactive oxygen species by mitochondria of rat heart. *Gen Physiol Biophys*. 2013;32(3):415–20.
9. Zadori D, Klivenyi P, Plangar I, Toldi J, Vecsei L. Endogenous neuroprotection in chronic neurodegenerative disorders: with particular regard to the kynurenines. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4):701–17.
10. Singh T, Newman AB. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev*. 2011;10(3):319–29.
11. Rodriguez MI, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Garcia JA, Ortiz F, et al. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res*. 2007;42(3):272–9.
12. Hawkey LC, Cacioppo JT. Stress and the aging immune system. *Brain Behav Immun*. 2004;18(2):114–19.
13. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Grant R. Changes in kynurenine pathway metabolism in the brain, liver and kidney of aged female Wistar rats. *FEBS J*. 2011;278(22):4425–34.
14. Snytnikova OA, Kopylova LV, Chernyak EI, Morozov SV, Kolosova NG, Tsentalovich YP. Tryptophan and kynurenine levels in lenses of Wistar and accelerated-senescence OXYS rats. *Mol Vis*. 2009;15:2780–8.
15. Beal MF, Swartz KJ, Isacson O. Developmental changes in brain kynurenic acid concentrations. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992;68(1):136–9.
16. Comai S, Costa CV, Ragazzi E, Bertazzo A, Allegri G. The effect of age on the enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rats. *Clin Chim Acta*. 2005;360(1–2):67–80.
17. Truscott RJ, Elderfield AJ. Relationship between serum tryptophan and tryptophan metabolite levels after tryptophan ingestion in normal subjects and age-related cataract patients. *Clin Sci (Lond)*. 1995;89(6):591–9.
18. Ribarac-Stepic N, Vulovic M, Koricanac G, Isenovic E. Basal and glucocorticoid induced changes of hepatic glucocorticoid receptor during aging: relation to activities of tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase. *Biogerontology*. 2005;6(2):113–31.
19. Cannazza G, Chiarugi A, Parenti C, Zanolli P, Baraldi M. Changes in kynurenic, anthranilic, and quinolinic acid concentrations in rat brain tissue during development. *Neurochem Res*. 2001;26(5):511–14.
20. Pertovaara M, Raitala A, Lehtimäki T, Karhunen PJ, Oja SS, Jylhä M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in nonagenarians is markedly increased and predicts mortality. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(5):497–9.

21. Bova LM, Sweeney MH, Jamie JF, Truscott RJ. Major changes in human ocular UV protection with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):200–5.
22. Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, et al. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain.* 1992;115(Pt 5):1249–73.
23. Baran H, Schwarcz R. Regional differences in the ontogenetic pattern of kynurenine aminotransferase in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993;74(2):283–6.
24. Kepplinger B, Baran H, Kainz A, Ferraz-Leite H, Newcombe J, Kalina P. Age-related increase of kynurenic acid in human cerebrospinal fluid - IgG and beta2-microglobulin changes. *Neurosignals.* 2005;14(3):126–35.
25. Walker DW, Curtis B, Lacey B, Nitsos I. Kynurenic acid in brain and cerebrospinal fluid of fetal, newborn, and adult sheep and effects of placental embolization. *Pediatr Res.* 1999;45(6):820–6.
26. Rejdak R, Zarnowski T, Turski WA, Kocki T, Zagorski Z, Guenther E, et al. Changes of kynurenic acid content in the rat and chicken retina during ontogeny. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002;240(8):687–91.
27. Moroni F, Russi P, Carla V, Lombardi G. Kynurenic acid is present in the rat brain and its content increases during development and aging processes. *Neurosci Lett.* 1988;94(1–2):145–50.
28. Gramsbergen JB, Schmidt W, Turski WA, Schwarcz R. Age-related changes in kynurenic acid production in rat brain. *Brain Res.* 1992;588(1):1–5.
29. Richter A, Loscher W, Baran H, Gramer M. Increased levels of kynurenic acid in brains of genetically dystonic hamsters. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;92(1):111–16.
30. Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Aldinio C. The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett.* 1984;47(1):51–5.
31. Coggan SE, Smythe GA, Bilgin A, Grant RS. Age and circadian influences on picolinic acid concentrations in human cerebrospinal fluid. *J Neurochem.* 2009;108(5):1220–5.
32. van der Goot AT, Zhu W, Vazquez-Manrique RP, Seinstra RI, Dettmer K, Michels H, et al. Delaying aging and the aging-associated decline in protein homeostasis by inhibition of tryptophan degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(37):14912–17.
33. Oxenkrug GF. The extended life span of *Drosophila melanogaster* eye-color (white and vermilion) mutants with impaired formation of kynurenine. *J Neural Transm.* 2010;117(1):23–6.
34. Coburn C, Gems D. The mysterious case of the *C. elegans* gut granule: death fluorescence, anthranilic acid and the kynurenine pathway. *Front Genet.* 2013;4:151.
35. Mazarei G, Budac DP, Lu G, Adomat H, Tomlinson Guns ES, Moller T, et al. Age-dependent alterations of the kynurenine pathway in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *J Neurochem.* 2013;127(6):852–67.
36. Finn SF, Hyman BT, Storey E, Miller JM, Beal MF. Effects of aging on quinolinic acid lesions in rat striatum. *Brain Res.* 1991;562(2):276–80.
37. Pocivavsek A, Wu HQ, Potter MC, Elmer GI, Pellicciari R, Schwarcz R. Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36(11):2357–67.
38. Misztal M, Skangiel-Kramska J, Niewiadomska G, Danysz W. Subchronic intraventricular infusion of quinolinic acid produces working memory impairment—a model of progressive excitotoxicity. *Neuropharmacology.* 1996;35(4):449–58.
39. Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Intrahippocampal administration of a glycine site antagonist impairs working memory performance of rats. *Eur J Pharmacol.* 1994;253(1–2):183–7.
40. Hlinak Z, Krejci I. Kynurenic acid and 5,7-dichlorokynurenic acids improve social and object recognition in male rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1995;120(4):463–9.

Daniela Ramírez Ortega, Dinora González Esquivel, Benjamín Pineda, Camilo Ríos and Verónica Pérez de la Cruz. Kynurenine Pathway in Aging En: Sandeep Mittal. Targeting the Broadly Pathogenic Kynurenine Pathway. Wayne State University, Detroit , MI, USA. Springer International Publishing Switzerland 2015. 430 pp.