



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA A DOS TIPOS DE RADIACIÓN IONIZANTE  
EN TEJIDOS CON DIFERENTE RADIOSENSIBILIDAD EN UN MODELO MURINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS ÁNGEL ALBARRÁN PONCE**

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**JUAN MIRANDA RÍOS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**IGNACIO CAMACHO ARROYO**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

MAYO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA A DOS TIPOS DE RADIACIÓN IONIZANTE  
EN TEJIDOS CON DIFERENTE RADIOSENSIBILIDAD EN UN MODELO MURINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS ÁNGEL ALBARRÁN PONCE**

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Director General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de marzo del 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LUIS ÁNGEL ALBARRÁN PONCE** con número de cuenta **306000605** con la tesis titulada **"COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA A DOS TIPOS DE RADIACIÓN IONIZANTE EN TEJIDOS CON DIFERENTE RADIOSENSIBILIDAD EN UN MODELO MURINO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**:

Presidente: DRA. ALICIA NEGRÓN MÉNDOZA  
Vocal: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ  
Secretario: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
Suplente: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES  
Suplente: DR. JUAN MIRANDA RÍOS

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de abril del 2017.

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Universidad misma, por brindarme la mejor educación que se puede obtener en el país y por hacer de mí, un profesional capaz de enaltecer el conocimiento y el desarrollo en México y en el mundo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme en la realización de este logro a través de la beca que recibí durante mis estudios (CVU: 625698 / No. de Apoyo: 385550).

A mi tutora, la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonparte por su constante apoyo y confianza depositada en mí, su disposición para ayudarme a encontrar nuevas respuestas y posibilidades y por forjar mi desarrollo como investigador. A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Juan Miranda Ríos y Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por sus comentarios, correcciones y su paciencia que me ayudaron a mejorar cada aspecto de mi trabajo y de mi quehacer como científico.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Nuevamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, simplemente porque nunca estaré suficientemente agradecido por todas las oportunidades, conocimiento, valores y amistades que la mejor casa de estudios del país me ha brindado a lo largo de tanto tiempo.

A la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt, primero por haberme aceptado como parte de su grupo de trabajo desde hace ya 6 años y también por ser un ejemplo claro de la satisfacción y la importancia del quehacer de un investigador.

Al Dr. Pavel Petrosyan, por toda la ayuda y los consejos brindados para mejorar mis resultados y mis técnicas, sin duda usted es uno de los grandes responsables de lo que soy como investigador y como científico. Gracias por tanto Pavel.

Al Dr. Miguel Tapia que, como responsable de la unidad de microscopía, me enseñó prácticamente todo lo que había que saber para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia y por ayudarme a obtener resultados que superaron por mucho mis expectativas.

A la M. en C. Daniela Silva, por apoyarme con anticuerpos, reactivos y consejos para poder realizar mis ensayos de inmunofluorescencia.

Al Dr. Jesús Ramírez, por su ayuda y su disposición que me permitieron obtener los cortes histológicos en el criostato.

A las Biólogas. Carla Garza y Cristina López, por siempre estar dispuestas a ayudarme con los sacrificios y extracciones de proteínas que me permitieron obtener las muestras para este proyecto.

A la M. en C. Silvana Cervantes, por sus consejos y su ayuda para llevar a cabo perfusiones adecuadas.

A la Dra. Rubio, que siempre me ha ayudado a mejorar mi trabajo con diferentes comentarios y por brindarme apoyo en cuestiones que van más allá de lo que tiene que ver con ciencia.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Isabel y Luis, porque siempre me han apoyado en cada decisión que he tomado, porque nunca me han dejado solo y porque cada una de las metas que he conquistado en mi vida se las debo a ustedes. Gracias por ser quienes son y por hacer de mí el hombre que soy, nunca podré retribuirles lo mucho que han hecho por mí y sólo quiero que sepan que este nuevo logro también es de ustedes. Los amo.

A mis hermanos, Eunice y Ricardo, por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas, por hacerme sentir completo en este mundo y por conocerme tanto y quererme incondicionalmente a pesar de todo. Gracias por formar parte de mí.

A mis abuelitas, mis tíos y mis primos, mi familia. Por siempre alentarme, festejarme y demostrarme que la familia es el pilar más importante en la vida de una persona. Porque sé que con ustedes nunca me faltarán risas y buenos momentos y por qué sé que también cuando los momentos se tornan difíciles, tendré siempre a quienes me acompañen y me ayuden.

A Silvana. Cachete, tú significas tantas cosas para mí, tu manera de ser y tu dedicación me demuestran todos los días que no hay meta que sea inalcanzable ni sueños que sean irrealizables. Este nuevo logro que hemos conquistado juntos me demuestra una vez más que unidos lo podemos todo. Gracias por aconsejarme, regañarme cuando es necesario, escucharme, acompañarme y por hacer de cada día, una experiencia bonita e inolvidable. Gracias por siempre estar a mi lado, por celebrar cada pequeño paso que doy, por darme la inspiración y las fuerzas siempre para seguir adelante a pesar de todo. Gracias por ser la persona que eres, por nunca dejarme solo y por luchar cada batalla que enfrento a mi lado. Gracias por ser la motivación que necesito para ser mejor y por compartir tus días y tu felicidad conmigo, por ser una de las razones por las que amo la vida. Confío en que el futuro nos depara muchos mañanas llenos de logros, felicidad, dicha y amor. Te amo por siempre.

A mis hermanitos: Roy, Lalo, José Luis, Sergio y Ricardo. La gente dice que los amigos son la familia que uno escoge y con ustedes eso no podría ser más verdad. Gracias por siempre estar, por apoyarme, por vivir tanto conmigo y por formar parte indivisible de mí. Porque estamos unidos mucho más allá de lo que la sangre nos podría unir. Los quiero viejitos.

Al lab: Carla, Lucio, Daniela, Cristina, Jorge. Gracias por compartir sus días conmigo y por ser una de las razones por las que ir a hacer ciencia sea para mí la antítesis de lo que significa trabajar. Gracias por sus consejos y todos los buenos ratos. Los quiero.

A Karina, por ser mi mejor amiga a pesar de todo, por estar siempre que te necesito y siempre tener las palabras adecuadas para mí sin importar la situación. A Alma, porque la distancia y el tiempo no hacen mella en nuestra amistad y porque verte significa poder hablar de absolutamente todo y compartir como si no pasara ni un día.



A todos mis amigos, que siempre me han escuchado y apoyado en distintos momentos de mi vida y por acompañarme en diferentes situaciones que me han hecho vivir de todo. Gracias por los buenos ratos, las risas, los sustos y todo el aprendizaje que han dejado en mí.

Dedicatoria especial a mi abuelita Margarita... no sabes lo mucho que me hubiera gustado que estuvieras aquí para festejar conmigo la culminación de otra etapa de mi vida. Gracias por haberme dado todo de ti y por contagiarme con todas esas ganas de disfrutar la vida. Estés donde estés, este logro, es para ti.

## ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	VI
Índice de Figuras	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
Introducción	1
Radiación Ionizante	2
Efectos Biológicos de la Radiación Ionizante	3
Estrés Oxidante	6
Daño Oxidante	8
Antioxidantes	9
Factor nuclear 2 (derivado del factor eritroide 2) (Nrf2)	11
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	13
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Material y Métodos	19
Protocolo de Irradiación	19
Sacrificio y Extracción de Tejidos	20
Extracción y Determinación de Proteínas	21
Ensayo de Western Blot	21
Ensayo de Inmunofluorescencia	23
Análisis Estadístico	24
Ética	24
Resultados	25
Discusión	35
Conclusiones	47
Referencias	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

RI	Radiación Ionizante
eV	Electrón-volt
Gy	Gray
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico mensajero)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies Reactivas de Oxígeno)
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación peroxidasa
Trx	Tiorredoxina
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
γGCS	γ-glutamil-cisteína sintetasa
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2 related factor 2</i> (Factor nuclear 2 derivado del factor eritroide 2)
ARE	<i>Antioxidant Response Elements</i> (Elementos de Respuesta Antioxidante)
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (Factor de crecimiento nervioso)
TrkA	<i>Tropomyosin receptor kinase A</i> (Receptor de tropomiosina cinasa A)
Akt	Proteína cinasa B
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (Glíderaldehído-3-fosfato dehidrogenasa)
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i> (Proteína de núcleo neuronal)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilidol
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas)
AP-1	<i>Activator Protein 1</i> (Proteína activadora 1)
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i> (Patrones moleculares asociados a daño)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de exposición a radiaciones naturales y antropogénicas	2
<b>Figura 2.</b> Acción directa e indirecta de la radiación ionizante.	4
<b>Figura 3.</b> Regulación de genes antioxidantes por Nrf2.	12
<b>Figura 4.</b> Montaje de los animales expuestos a rayos X	20
<b>Figura 5.</b> Montaje de los animales expuestos a radiación $\gamma$ .	20
<b>Figura 6.</b> Modulación de NGF por rayos X en tejidos de ratón	26
<b>Figura 7.</b> Modulación de NGF por radiación $\gamma$ en tejidos de ratón	27
<b>Figura 8.</b> Inmunofluorescencia contra Nrf2/NeuN/DAPI en ratones control.	28
<b>Figura 9.</b> Inmunofluorescencia contra Nrf2/NeuN/DAPI en ratones expuestos a radiación $\gamma$ .	30
<b>Figura 10.</b> Inmunofluorescencia contra Nrf2 en ratones control.	30
<b>Figura 11.</b> Inmunofluorescencia contra Nrf2 en ratones expuestos a radiación $\gamma$ .	31
<b>Figura 12.</b> Modulación de Nrf2 por radiación $\gamma$ en regiones de cerebro.	32
<b>Figura 13.</b> Inmunofluorescencia a 20X contra Nrf2/NeuN en ratones control	33
<b>Figura 14.</b> Inmunofluorescencia a 20X contra Nrf2/NeuN en ratones expuestos a radiación $\gamma$	34
<b>Figura 15.</b> Posible mecanismo de señalización entre NGF y Nrf2.	46

## RESUMEN

La radiación ionizante (RI) es un tipo de radiación que cuenta con la capacidad de desplazar a los electrones de los átomos presentes en la materia con la que interactúa, como ejemplos de ella se pueden encontrar a los rayos X y la radiación  $\gamma$ . La absorción de RI por las células puede producir alteraciones en la estructura y la función de las biomoléculas. Estas perturbaciones dependen en gran medida del grado de diferenciación del tejido, tasa de proliferación y tasa metabólica. El daño se genera a través de dos vías principales: una vía directa (alterando la estructura atómica de las macromoléculas) o una vía indirecta (produciendo especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la radiólisis del agua). Mediante la vía indirecta se produce cerca de 2/3 partes del daño total por la exposición a radiación, principalmente por acción del radical  $\text{HO}^\bullet$ . Existen mecanismos antioxidantes para combatir el daño producido por las ROS, dentro de los cuales, Nrf2 y NGF juegan un papel importante para iniciar este tipo de respuestas. En este trabajo se investigó la modulación de NGF en el cerebro, el hígado, la médula ósea roja y los pulmones de ratones expuestos a 0.5 Gy de rayos X y radiación  $\gamma$ , así como de Nrf2 por radiación  $\gamma$  en el cerebro. Los rayos X indujeron los niveles de NGF en el cerebro e hígado a las 6 h y en el pulmón a las 4 y 6 h; se observó una disminución de NGF en la médula a las 2 h. Por su parte, la radiación  $\gamma$  indujo a NGF en el cerebro a las 2 h y en el pulmón a las 6 h, mientras que los niveles disminuyeron en el hígado a las 2 h y en la médula a las 2, 4 y 6 h. Por otro lado, la radiación  $\gamma$  produjo un incremento en los niveles de Nrf2, respuesta que varía al comparar distintas regiones dentro del cerebro. Específicamente, se observaron incrementos en la corteza, el tálamo y el cerebelo, mientras que en el hipocampo y el cuerpo estriado no se observaron cambios. Nuestros resultados muestran que: i) la exposición a RI es capaz de inducir una respuesta antioxidante en el cerebro a través de NGF y Nrf2; ii) las respuestas a la RI dependen no sólo del tejido que es irradiado, sino también del tipo de radiación empleado y iii) dentro de un mismo tejido, distintos tipos celulares responden de manera diferencial a la RI. Sugerimos que Nrf2 y NGF participen en la misma vía de señalización para activar la respuesta antioxidante.

## ABSTRACT

Ionizing radiation (IR) is a type of radiation that can displace the electrons of the atoms that conform the matter with which it interacts, two examples of this type of radiation are X rays and  $\gamma$  radiation. Absorption of IR by cells produces alterations in the structure and function of the biomolecules. These disturbances depend highly on each tissue differentiation, proliferation and metabolic rates. Such damages are generated through two different mechanisms: a direct pathway (disruption of the atomical structure of macromolecules) or an indirect pathway (production of reactive oxygen species as a result of water radiolysis). Approximately 2/3 of the DNA damage are generated because of the exposition to IR are produced through the indirect pathway, mainly by way of the HO<sup>•</sup> radical action. Cells have antioxidant mechanisms to contend with the oxidative damage, in which both Nrf2 and NGF play an important role in the initiation of this kind of responses. We investigated the modulation of NGF in the brain, liver, red bone marrow and lungs of mice exposed to 0.5 Gy of X rays and  $\gamma$  radiation, as well as Nrf2 by  $\gamma$  radiation in the brain. X rays induced the levels of NGF at 6 h in the brain and liver and at 4 and 6 h in the lungs; on the contrary, there was a decrease in NGF levels in the red bone marrow at 2 h. As for the  $\gamma$  radiation, there was a rise in the levels of the neurotrophin at 2 h in the brain and at 6 h in the lungs, whereas there was a decline in these levels in the liver at 2 h and in the bone marrow at 2, 4 and 6 h. On the other hand,  $\gamma$  radiation induced an increase in the levels of Nrf2 in the brain, showing differences in the response when comparing different regions of this organ. More specifically, there were increased levels of this transcription factor in the cortex, thalamus and cerebellum, while in the hippocampus and striatum there no changes were observed. Our results show that: i) IR exposition can initiate an antioxidant cascade in the brain via NGF and Nrf2, ii) IR antioxidant responses are dependent of the type of tissue that is irradiated and iii) even within the same tissue, different cellular types react in a differential manner to IR. Our data suggest that NGF and Nrf2 are part of the same signaling pathway involved in the activation of the antioxidant response against IR.

## INTRODUCCIÓN

### *Radiación Ionizante*

La radiación puede definirse como la transmisión de energía en forma de ondas o partículas a través de algún medio o en el vacío (Attix, 1986). Existe un tipo de radiación denominada radiación ionizante (RI) que tiene la capacidad de desplazar un electrón orbital de un átomo perteneciente a la materia con la cual interactúa, en un fenómeno denominado como ionización (Bushong, 2013).

Las radiaciones ionizantes pueden caracterizarse con base en su energía expresada en electrón-volts (eV), definidos como la energía adquirida por un electrón cuando pasa por un campo eléctrico constante con un potencial de 1 volt (Kudryashov, 2008). La energía necesaria para que un electrón escape de un átomo abarca un intervalo que va de los 4 a los 25 eV, por tanto, las radiaciones ionizantes deben de contar con una energía que exceda estos valores para producir ionizaciones en la materia (Attix, 1986).

En general, existen dos tipos de RI: fotones de radiación electromagnética (radiación  $\gamma$  y rayos X) y radiación corpuscular (partículas aceleradas de núcleos atómicos) (Kudryashov, 2008). La RI electromagnética se define, en parte, por contar con longitudes de onda que se encuentran por debajo de los  $10^{-12}$  m y por emitir un intervalo de energía que va de los 2.6 keV (característicamente Rayos X) hasta los 6.1-7.1 MeV (Radiación  $\gamma$ ) (Attix, 1986). Por otro lado, los rayos X y la radiación  $\gamma$  también se diferencian por su origen. Los primeros se emiten de electrones que cambian de nivel energético o que interactúan con campos coulombianos mientras que la radiación  $\gamma$  se produce en las desintegraciones de núcleos atómicos o como resultado de las reacciones entre materia y anti-materia (Attix, 1986).

Los seres humanos estamos expuestos a este tipo de radiación por fuentes tanto naturales como antropogénicas. Dentro de las primeras se encuentran depósitos de minerales radiactivos (tales como Uranio y Torio) presentes en la corteza terrestre, así como

rayos cósmicos representados por partículas cargadas provenientes del Sol y otras estrellas (UNSCEAR, 2008; Bushong, 2013). Asimismo, en los organismos existen cantidades traza de radionúclidos consumidos como parte de la ingesta o bien, como metabolitos naturales de ésta (*i. e.* potasio y carbono) (UNSCEAR, 2008; Coss-Rojas, 2014). Sin embargo, la fuente de exposición natural más importante es el radón, un gas ubicuo producido como resultado del decaimiento del uranio (Bushong, 2013).

En lo que se refiere a las fuentes de radiación producidas por el hombre, aquellas empleadas en procedimientos médicos aportan la mayor parte de la exposición antropogénica (Revisado por Coss-Rojas, 2014). En los últimos años, la exposición a radiación ionizante de uso clínico se ha incrementado hasta alcanzar cerca del 50% de la exposición total en humanos (Figura 1) (NCRP, 2009). En este contexto, los procedimientos de radiodiagnóstico, medicina nuclear y radioterapia conforman gran parte de la exposición antropogénica (Bushong, 2013; Coss-Rojas, 2014). Sólo en los Estados Unidos, el uso de tomografías computarizadas tuvo como resultado un aumento de 5 a 30% en la exposición total a rayos X por procedimientos médicos entre 1980 y 2001 (Nickoloff y Anderson, 2001).

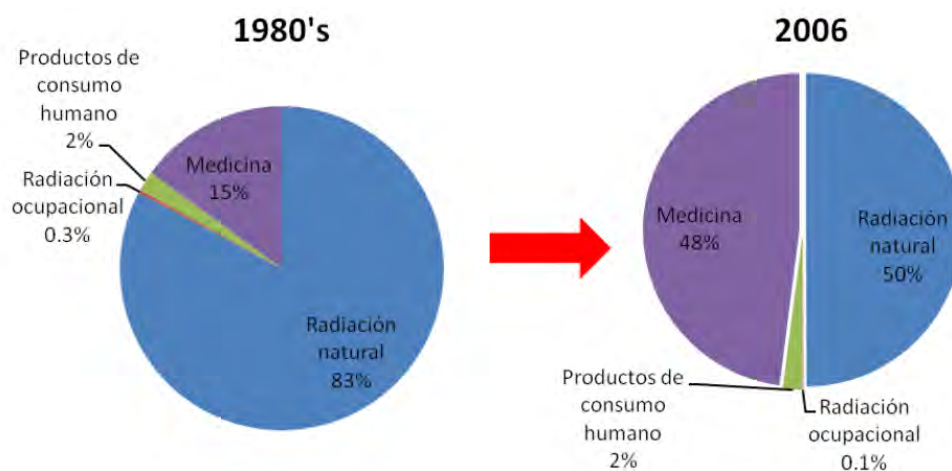


Figura 1. Representación del porcentaje de exposición a radiaciones ambientales naturales y radiaciones producidas por el hombre. (Tomado de Coss-Rojas, 2014).



Además, existen otras fuentes de menor importancia provenientes de procesos de generación de energía nuclear, accidentes nucleares, transporte de material radiactivo y pruebas de armas nucleares (UNSCEAR, 2008).

### ***Efectos Biológicos de la Radiación Ionizante.***

La RI puede inducir efectos deletéreos cuando interactúa con las células. En la mayoría de los casos, dichos efectos se presentan como alteraciones en el DNA entre las que destacan: las alteraciones cromosómicas, cambios de ploidía, mutaciones y/o amplificaciones de genes y formación de micronúcleos, entre otras (Morgan, 2003; Hall y Giaccia, 2012).

De acuerdo con Platzman (1958), la absorción de fotones de radiación ionizante por las células se puede dividir en cuatro fases:

1. **Etapa Física.** Implica la deposición de energía causada por la radiación incidente y deriva en la generación de electrones secundarios ( $10^{-16}$  s post-irradiación).
2. **Etapa Físico-Química.** Se caracteriza por una rápida reorganización de especies químicas inestables (radicales libres) producidas en la primera etapa. Finalmente, los radicales se distribuyen de manera no homogénea ( $10^{-12}$  s).
3. **Etapa de Química no Homogénea.** Las especies químicas reactivas difunden y reaccionan unas con otras o con el ambiente celular hasta alcanzar el punto en que su propia reactividad sea neutralizada ( $10^{-6}$  s).
4. **Etapa Biológica.** Las células responden a los daños producidos durante las etapas anteriores. En este punto, se inician las respuestas y cascadas de señalización que derivan en las consecuencias de exposiciones a largo plazo ( $10^{-3}$  s).

Estos efectos se producen como consecuencia de dos vías principales de interacción entre la RI y las células. La primera de estas vías involucra ionizaciones directas en las estructuras atómicas de las macromoléculas que resultan en la pérdida de estructura y función de las mismas; este tipo de interacción se denomina efecto directo de la RI. Por su

parte, el efecto indirecto implica la ionización de moléculas de agua, hecho que deriva en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) las cuales finalmente interaccionan y dañan a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Figura 2) (Riley, 1994; Azzam, 2012; Hall y Giaccia, 2012).

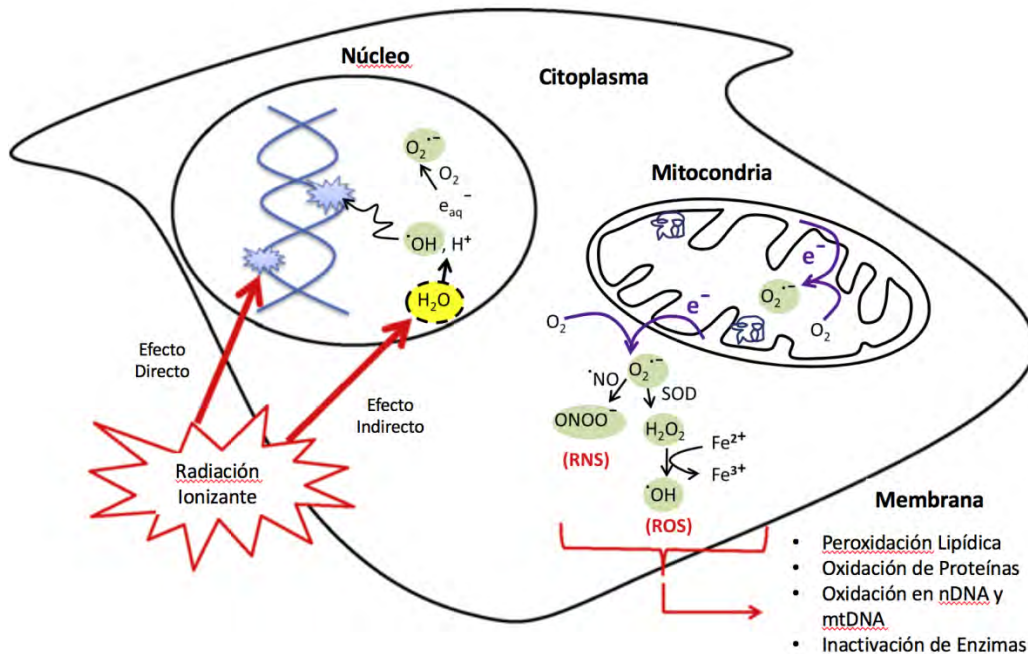
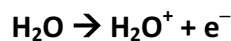


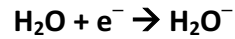
Figura 2. Esquematación de los efectos producidos por la acción directa e indirecta de la radiación ionizante en los sistemas biológicos.

De acuerdo con Vázquez-Vázquez (2011), los radicales producidos por la radiólisis del agua siguen el mecanismo descrito a continuación:

La absorción de radiación ionizante por parte de una molécula de agua resultará en una ionización y, consecuentemente, en la pérdida de un electrón. Como resultado de ésta ionización, se formará un ion positivo:



El electrón liberado por la ionización puede ser capturado por otra molécula de agua y, como resultado, se formará otro ion, esta vez negativo:



Ambos iones son altamente inestables y se descomponen para dar origen a nuevos iones y radicales:



Los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  pueden combinarse para volver a formar una molécula de agua. Sin embargo, el radical  $\text{OH}^\bullet$  es capaz de reaccionar prácticamente con todas las moléculas presentes en los organismos, aunque también pueden reaccionar entre sí para formar peróxido de hidrógeno:



Tomando en cuenta que el principal componente de las células es agua ( $\approx 80\%$ ), los daños causados por la acción indirecta de la radiación adquieren una mayor relevancia. Esto se debe a que el desbalance entre las especies reactivas producidas y la capacidad antioxidante del sistema deriva en la generación de estrés oxidante (Riley, 1994; Hall, 2012). Incluso se han hecho estimaciones que calculan que aproximadamente  $2/3$  del daño que causa la radiación ionizante al DNA se produce por el efecto indirecto (Azzam, 2012).

De igual forma, es importante mencionar que cada tipo celular puede presentar distintos niveles de afectación una vez que han sido expuestos a radiación ionizante, esto se define como radiosensibilidad (Vázquez-Vázquez, 2011).

Este fenómeno está descrito por la ley de la radiosensibilidad postulada por Bergonié y Tribondeau en 1906 (Vogin y Foray, 2013), cuyos postulados principales son:

- Las células con una alta actividad mitótica y una alta tasa metabólica son radiosensibles.
- Las células con un mayor porvenir filogenético, *i. e.* que requieran más divisiones para alcanzar su diferenciación, son radiosensibles.
- Los tejidos con un menor grado de diferenciación son radiosensibles.

Tomando en consideración estas aseveraciones, los órganos como la médula ósea roja, el timo o el bazo son considerados órganos radiosensibles, mientras que el corazón y el cerebro se consideran como radiorresistentes (Suciu, 1983). Los linfocitos son una excepción a esta ley, pues son células muy radiosensibles a pesar de no contar con las características que se enuncian (Alcaraz-Baños, 2003).

### ***Estrés Oxidante***

Como se mencionó previamente, la principal vía a través de la cual la radiación ionizante daña a los organismos es la generación de radicales libres en la forma de ROS debido al efecto indirecto (Azzam, *et al.*, 2012).

Según Halliwell y Gutteridge (2007), un radical libre puede definirse como “cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados”.

En este sentido, cualquier compuesto que puede aceptar electrones se conoce como agente oxidante, contrario a esto, una sustancia capaz de donar electrones es un agente reductor (Lodish *et al.*, 2008). Comúnmente, en los seres vivos un agente reductor suele actuar donando hidrógenos o donando oxígenos y los agentes oxidantes ganan oxígenos o electrones; en ambientes biológicos estos agentes se denominan como antioxidantes y pro-oxidantes, respectivamente (Kohen y Nyska, 2002). Al balance entre pro-oxidantes y antioxidantes se le conoce como potencial redox y es específico para cada organelo y

compartimento biológico en las células (Kohen y Nyska, 2002). Con base en lo anterior, el término estrés oxidante se refiere al “desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, conllevando a un riesgo potencial de daño oxidante” (Sies, 1997; Halliwell, 2006, 2011).

En las células, la mayoría de los efectos pro-oxidantes son producidos por las ROS (Kohen y Nyska, 2002). Este término engloba tanto a radicales derivados del oxígeno como a especies no reactivas basadas en oxígeno que fácilmente pueden dar origen a radicales libres o bien pueden causar daño oxidante por sí mismos (Tabla 1) (Halliwell, 2001; 2006).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS). Se muestran tanto los radicales de oxígeno como los no-radicales que pueden convertirse fácilmente en radicales (Modificado de Halliwell, 2006).

<b>Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)</b>	
<i>Radicales</i>	<i>No Radicales</i>
Anión Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2$
Hidroxilo, $HO^{\bullet}$	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, $RO_2^{\bullet}$	Ácido hipobromoso, HOBr
Alcoxilo, $RO^{\bullet}$	Ozono, $O_3$
Hidroperoxilo, $HO_2^{\bullet}$	Oxígeno singulete, $^1O_2$
	Peroxinitrito, $ONOO^-$

A este respecto, el radical  $HO^{\bullet}$  es considerado como la ROS más reactiva de todas, aunque para ejercer daño debe producirse en un sitio cercano a sus objetivos biológicos, pues tiene poca capacidad de difusión (Kohen y Nyska, 2002, Halliwell y Gutteridge, 2007). Por su parte, las ROS  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  son menos reactivas, pero tienen una alta capacidad de difusión, por lo que pueden generar daños en sitios alejados de su origen (Revisado por Sies, 1997; Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007). Es importante mencionar que la mayor parte del daño originado como consecuencia de la exposición a radiación ionizante se debe al radical  $HO^{\bullet}$ , derivado de la radiólisis del agua (Halliwell, 1994, 2001).

### ***Daño Oxidante***

En las células, la producción de ROS es relevante debido a que pueden producir alteraciones en las macromoléculas. A continuación, se presenta un breve resumen de los daños producidos por el estrés oxidante en ellas.

*Lípidos.* Las afectaciones en estas moléculas se denominan comúnmente como peroxidación lipídica, misma que se presenta cuando las ROS atacan a los carbonos que forman parte de los grupos metileno de los lípidos (Revisado por Kohen y Nyska, 2002). Como resultado de esta interacción, se produce un radical peroxilo ( $RO_2\bullet$ ) que inicia una reacción en cadena en la cual los carbonos adyacentes también son oxidados hasta que el radical  $RO_2\bullet$  sea neutralizado (Revisado por Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007).

La peroxidación lipídica disminuye la fluidez de la membrana, incrementa su permeabilidad y daña proteínas membranales, lo que resulta en la inactivación de receptores, enzimas y canales iónicos (Halliwell, 2006). Si el daño continua, eventualmente se induce la pérdida de la integridad membranal, *i. e.* se produce la ruptura de las membranas (Halliwell, 2006).

*Proteínas.* Los radicales  $HO\bullet$  y  $RO\bullet$  son los principales causantes del daño a proteínas, *e. g.* el radical  $HO\bullet$  puede atacar los enlaces peptídicos al abstraer el H (Halliwell y Gutteridge; 2007). Por otro lado, aunque los radicales  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  casi no tienen efectos en las proteínas también pueden reaccionar con los grupos  $-SH$  y oxidarlos para formar enlaces disulfuro (Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007). Como consecuencia se pueden dañar aminoácidos específicos y se pueden presentar cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación de las proteínas (Kohen y Nyska, 2002). El daño en las proteínas puede inducir mecanismos de respuesta a estrés que derivan en la pérdida de la actividad enzimática, alteración de funciones celulares o interferencia con la creación de potenciales de membrana (Kohen y Nyska, 2002).

*DNA*. Aunque el DNA es una molécula altamente estable, también es susceptible a ser dañado por las ROS de distintas maneras. Dentro de las alteraciones producidas, destacan las modificaciones de bases nitrogenadas, que de no ser reparadas, pueden derivar en rompimientos de cadena doble y sencilla y pérdida de purinas/pirimidinas (Revisado por Kohen y Nyska, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007). Es importante mencionar que gran parte de los efectos deletéreos en el DNA se producen por la interacción del radical HO• con los nucleótidos (Kohen y Nyska, 2007). La guanina es particularmente susceptible a este radical, ya que cuenta con un menor potencial redox en comparación con el resto de las bases nitrogenadas, razón por la cual, puede oxidarse rápidamente dando origen a la formación de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) (Halliwell, 2001, 2006; Singh *et al.*, 2013).

En última instancia, el estrés oxidante se ha asociado no sólo con daño celular y tisular, sino con la generación y propagación de diversas patologías tales como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, diabetes, obesidad, aterosclerosis, insuficiencia renal, inflamación, artritis reumatoide e hipertensión arterial entre otras (Revisado por Elejalde-Guerra, 2001; Halliwell, 2011).

### ***Antioxidantes***

Los efectos ROS son combatidos por antioxidantes definidos como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con la de un sustrato oxidable, previene o retrasa de manera significativa la oxidación de dicho sustrato” (Halliwell, 2001).

Los sistemas biológicos cuentan con tres tipos principales de antioxidantes: i) enzimas antioxidantes, ii) proteínas antioxidantes no catalíticas y iii) antioxidantes de bajo peso molecular (Kohen y Nyska, 2002; Ma, 2013).

En el caso de los primeros, las tres clases principales de enzimas antioxidantes son las superóxido dismutasas (SOD), las catalasas (CAT) y las glutatión peroxidasas (GPx). La

SOD se encarga de catalizar la conversión del radical  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  (Halliwell, 2001; Kohen y Nyska, 2002). Por su parte, la CAT lleva a cabo la conversión de 2 moléculas de  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ , esta enzima adquiere mayor relevancia cuando se presentan altas concentraciones de  $H_2O_2$  (Kohen y Nyska, 2002). Empero, el sistema de remoción de  $H_2O_2$  más importante en las células humanas es la GPx (Halliwell, 2001), pues tiene una mayor afinidad por su sustrato y puede removerlo cuando se encuentra en bajas concentraciones (Kohen y Nyska, 2002).

Por su parte, el grupo de antioxidantes no catalíticos está representado por las tiorredoxinas (Trx) y las glutarredoxinas (Grx) (Ma, 2013). Ambas proteínas pueden fungir como sensores del potencial redox celular y también pueden actuar como donadores de electrones para reducir los puentes disulfuro de las proteínas (Ahsan *et al.*, 2009).

Finalmente, el grupo de antioxidantes de bajo peso molecular, puede neutralizar a las ROS a través de la donación de electrones a los radicales de oxígeno para que de esta manera se reduzcan las posibilidades de que ataquen a sus blancos biológicos (Kohen y Nyska, 2002). Dentro de este grupo, el glutatión (GSH) es considerado como el principal antioxidante intracelular, se puede encontrar en concentraciones de hasta 10 mM (Shelly, 2009). El GSH puede reducir de manera directa varios tipos de ROS (*e. g.*  $HO^{\bullet}$ ,  $RO_2^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ , HOCL y  $ONOO^-$ ) a través de la donación de electrones, o bien como cofactor de la GPx (Halliwell, 2001; Kohen y Nyska, 2002). Cabe resaltar que, en medios acuosos, el GSH puede neutralizar de manera muy eficiente al radical  $HO^{\bullet}$  (Yadav y Mishra 2013). Por último, este tripéptido también puede actuar como quelante y participar en procesos tales como el plegamiento de las proteínas y su degradación (Kohen y Nyska, 2002).

De esta manera, los antioxidantes proveen de mecanismos eficientes a las células para remover y prevenir la formación de ROS y de esta manera evitar el daño oxidante.



### ***Factor nuclear 2 (derivado del factor eritroide 2) (Nrf2)***

La expresión de gran parte de las enzimas antioxidantes está regulada por los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE por sus siglas en inglés), que son secuencias potenciadoras presentes en los promotores de los genes de dichas enzimas (Nguyen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012).

Esta vía, a su vez, está controlada en gran medida por el factor nuclear 2 (relacionado al factor eritroide 2) (Nrf2). Dicha proteína pertenece a la familia de factores de transcripción de tipo “cap ‘n’ collar” que cuentan con un cierre de leucina en su región básica (Königsberg-Fainstein, 2007; Ma, 2013). En condiciones fisiológicas, Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a su represor Keap1, encargado del control de la actividad de este factor de transcripción (Ma, 2013; Turpaev, 2013). Lo anterior se logra debido a que Keap1 también interactúa con la ubiquitin ligasa Cul3, situación que promueve la ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de Nrf2 (Königsberg-Fainstein, 2007; Ma, 2013; Turpaev, 2013). A través de este proceso, Nrf2 se degrada continuamente, razón por la cual su vida media aproximada es de entre 15 y 20 minutos (Li *et al.*, 2012; Ma, 2013). Además, Keap1 también puede unirse a elementos del citoesqueleto, por lo que puede mantener secuestrado a Nrf2 en el citoplasma y evitar su translocación al núcleo aún sin inducir la degradación de éste (Königsberg-Fainstein, 2007).

No obstante, Keap 1 cuenta con una gran variedad de residuos de cisteína (25 a 27) que son susceptibles a modificaciones por interacciones con moléculas oxidantes o electrófilos (Königsberg-Fainstein, 2007; Kansanen *et al.*, 2013). Específicamente, la modificación de las cisteínas C151, C273 y C288 deriva en la alteración de la conformación estructural de Keap1 (Kansanen *et al.*, 2013; Turpaev, 2013). Este hecho resulta en la disociación del complejo Keap1/Nrf2 que conlleva la inhibición de la ubiquitinación de Nrf2 y la translocación al núcleo de este último (Figura 3) (Königsberg-Fainstein, 2007; Ma, 2013; Turpaev, 2013).

Una vez en el núcleo, Nrf2 se une a proteínas Maf pequeñas por medio del cierre de leucina presente en su dominio bZip (Ma, 2013). Si bien Nrf2 es capaz de interactuar con otro tipo de proteínas con regiones bZip como c-Fos o Fra1, el acoplamiento con las proteínas Maf pequeñas parece ser imprescindible para que se produzca la unión con la región ARE (Königsberg-Fainstein, 2007; Ma, 2013).

De este modo, Nrf2 induce la síntesis de diferentes proteínas que participan en el mantenimiento de la homeostasis redox entre las que destacan:  $\gamma$ -GCS, HO-1, Trx, Trx-R, xCT y NQO1 (Ma, 2013).

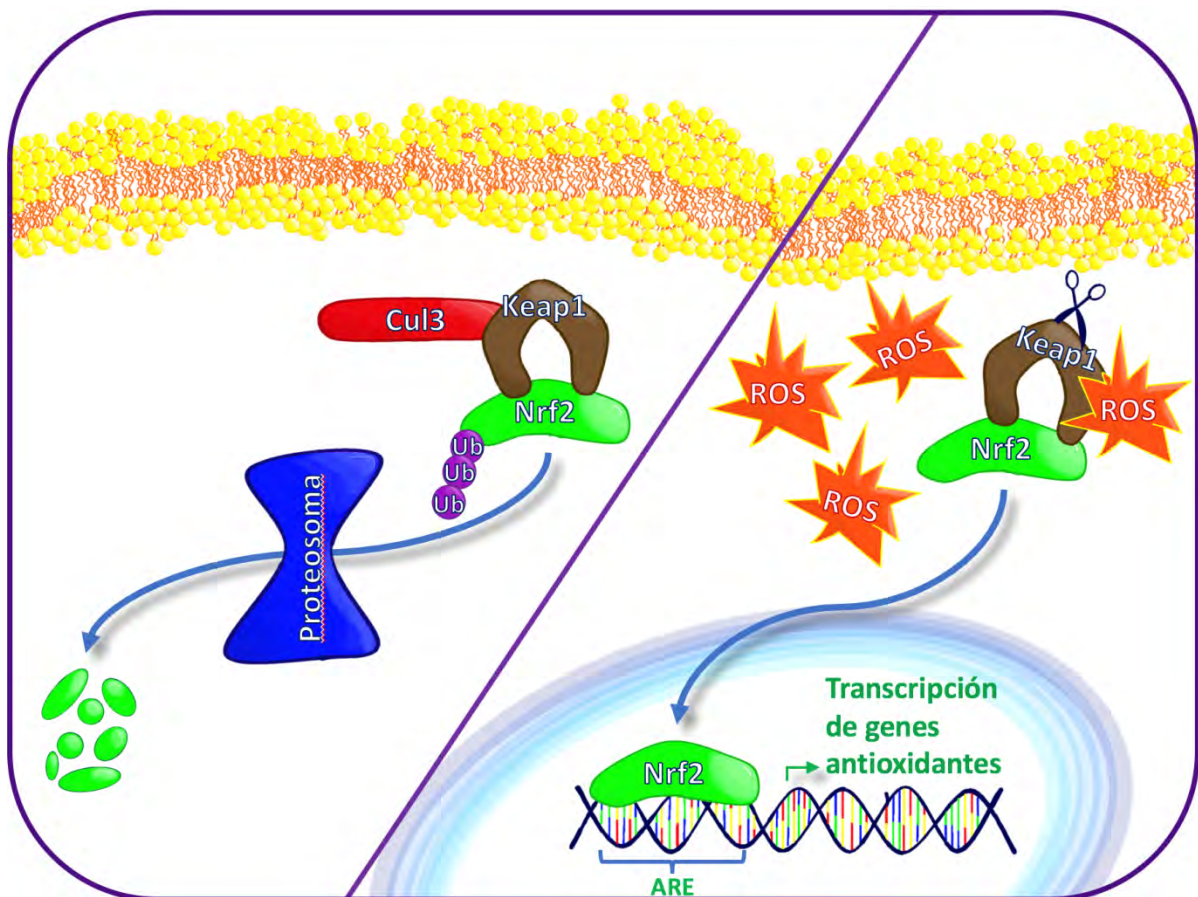


Figura 3. Regulación de la expresión de genes antioxidantes por Nrf2. A la izquierda se muestra la degradación de Nrf2 en condiciones fisiológicas: Keap1 promueve la ubiquitinación del factor de transcripción mediante la ligasa Cul3 y Nrf2 es degradado por la vía del proteosoma. A la derecha se observa la actividad de Nrf2 en condiciones oxidantes: las ROS oxidan residuos de Cys específicos en Keap1, lo cual promueve la disociación de Nrf2 y su posterior translocación a núcleo, dónde se une a las regiones ARE y promueve la transcripción de antioxidantes.

### ***Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)***

Diversas moléculas pueden participar en la inducción de la vía antioxidante, dentro de las que se encuentra el factor de crecimiento nervioso (NGF). Esta proteína, pertenece a una familia de factores de crecimiento denominados neurotrofinas, dentro de la cual también se encuentran el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Davies, 1994; Lewin y Barde, 1996; Lu *et al.*, 2005).

Al igual que el resto de las neurotrofinas, NGF es sintetizado inicialmente en la forma de un precursor de mayor tamaño (30-35 kDa) que deben ser procesados por diferentes proteasas para dar origen a la neurotrofina madura de aproximadamente 13 kDa (Friedman y Gene, 1999; Lu *et al.*, 2005). Dicho precursor recibe la denominación de pro-NGF y su maduración en NGF se puede llevar a cabo por furinas y convertasas en el interior celular o por metaloproteasas y plasminas en el espacio extracelular (Lu *et al.*, 2005).

De acuerdo con Levi-Montalcini (1987) existen tres funciones principales que NGF maduro lleva a cabo en las neuronas simpáticas y sensoriales:

- i. El rol trófico vital durante las etapas tempranas del desarrollo
- ii. La propiedad con que cuenta para intensificar procesos de diferenciación como la extensión de neuritas
- iii. La capacidad de guiar el crecimiento o regeneración de neuritas a través de su propio gradiente de concentración.

Estas respuestas se presentan cuando NGF interactúa con su receptor de alta afinidad de tipo tirosina-cinasa denominado como TrkA, promoviendo la dimerización y transfosforilación de éste (Wiessman y de Vos, 2001; Reichardt, 2006). Esta interacción promueve la iniciación de distintas vías de señalización a través de la fosforilación específica de dos residuos de tirosina específicos en TrkA: Y490 e Y785 (Sofroniew *et al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2003). De manera más concreta, la fosfo-Y490 está relacionada con las vías Ras-Raf-Erk y PI3K-Akt, mientras que la fosfo-Y785 induce la vía de la PLC- $\gamma$ -PKC  $\delta$  (Sofroniew *et*

*al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006). Todas estas vías están implicadas en las funciones de sobrevivencia y diferenciación de NGF, sin embargo, parece ser que la vía de PI3K-Akt está más involucrada en respuestas antioxidantes (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013).

Aunque originalmente las funciones de NGF se describieron únicamente en tejidos nerviosos, existen evidencias de la presencia de esta neurotrofina y su receptor TrkA en tejidos tales como el iris, el corazón, los riñones, el hígado, el pulmón y el bazo, entre otros (Yamamoto *et al.*, 1996; Lommatszch *et al.*, 2005).

Como ya se mencionó, NGF también puede participar en la inducción de una respuesta antioxidante independientemente de las funciones que lleva a cabo en las neuronas.

En modelos *in vitro*, existen trabajos llevados a cabo en la línea celular de tumores de médula adrenal de ratón (PC12) en los que se ha probado que la adición de NGF protege a las células del daño por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la inducción de la actividad de la CAT (Jackson *et al.*, 1990). Del mismo modo, existen evidencias que indican que NGF incrementa los niveles de expresión y la actividad de GPx y CAT (Sampath *et al.* 1994). Finalmente, Pan y Pérez-Polo (1993) demostraron que la adición de NGF puede modular de manera positiva la actividad de GSH y de enzimas tales como la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-D) de manera dosis-dependiente, lo que sugiere que esta NT está involucrada en los procesos de síntesis *de novo* de GSH.

Por otro lado, en modelos *in vivo*, se ha demostrado que NGF es capaz de restaurar los niveles de las enzimas SOD, GPx y CAT (mismos que decrecen en edades avanzadas) en diferentes regiones del cerebro de ratas envejecidas (Nistico *et al.*, 1992). También se ha demostrado la acción de NGF en la respuesta antioxidante en modelos de neurodegeneración. En particular, en un modelo de parkinsonismo en el tálamo, se

demostró que la adición de NGF puede restaurar los niveles de la SOD y la GPx una vez que éstos han disminuido como consecuencia de la acción de la neurotoxina MPTP (Ninković *et al.*, 2000). Del mismo modo, en un modelo murino de enfermedad de Huntington por ácido quinolínico, se demostró que NGF puede mantener el cociente 2GSH/GSSG en el cuerpo estriado e hipocampo (Maksimović *et al.*, 2001).

Aunado a las evidencias citadas en los párrafos anteriores, existen estudios que prueban que NGF puede llevar a cabo su capacidad antioxidante en otros tejidos además del SNC. Específicamente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que diversos promotores de estrés oxidante (arsénico, butionil sulfoximina y acetaminofén) modulan de manera positiva la transcripción de NGF en el hígado. En este mismo modelo, esta NT induce incrementos en los niveles de mRNA de proteínas antioxidantes tales como la Trx a través de un mecanismo autócrino que involucra a la vía de señalización NGF/TrkA/PI3k/Akt (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013). Aunado a esto, se demostró que la transcripción del mRNA de NGF es inducida en cerebros de ratones expuestos a radiación ionizante (Albarrán-Ponce, 2014).

Tomados en conjunto, todos estos estudios sugieren que NGF puede ejercer una función neuroprotectora en enfermedades neurodegenerativas a través de la regulación de la capacidad antioxidante en el SNC.

## **JUSTIFICACIÓN**

La radiación ionizante produce daños en los seres vivos a través de la generación de especies reactivas tales como los radicales HO•. Si la producción de dichas especies no es detenida, la exposición a radiación ionizante puede derivar en daños a las biomoléculas. NGF y Nrf2 son dos proteínas que destacan por su estrecha relación en las vías de señalización implicadas en la respuesta antioxidante. Además, las respuestas inducidas por la radiación dependen ampliamente de las características proliferativas y de diferenciación de cada tejido irradiado. Es por ello, que resulta de interés estudiar los efectos que radiaciones ionizantes con diferente tasa energética tienen en la generación de mecanismos de defensa contra el daño oxidante en tejidos con diferentes radiosensibilidades.

## **HIPÓTESIS**

Ambos tipos de radiación ionizante inducirán los niveles de NGF en los tejidos más radioresistentes. Asimismo, la radiación  $\gamma$  incrementará la expresión de Nrf2 de manera diferencial en distintas regiones del cerebro.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo General***

- Investigar la modulación de proteínas involucradas en la respuesta antioxidante por radiaciones ionizantes con diferente tasa energética en tejidos de ratón.

### ***Objetivos Particulares***

- Desarrollar ensayos curso-temporales con dos tipos de radiaciones ionizantes: rayos X y radiación  $\gamma$ .
- Estimar en cada caso los niveles de proteína de NGF en cerebro, pulmón, hígado y médula ósea roja de ratones Balb/c expuestos a una dosis de 0.5 Gy de radiación ionizante.
- Evaluar la expresión de Nrf2 en el cerebro de los ratones.
- Determinar si existe relación entre los niveles de NGF y Nrf2 con el tipo de celular irradiado.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Protocolo de Irradiación.*

Los animales usados en este estudio fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM. Se emplearon ratones machos de la cepa BALB/c, con una edad de entre 5 y 7 semanas y un peso promedio de  $22.02 \pm 1.08$  g. En nuestro grupo de trabajo se demostró previamente que la radiación  $\gamma$  puede generar alteraciones en vías de señalización antioxidante en exposiciones a dosis tan bajas como 0.5 Gy (Vázquez-Vázquez, 2011; Albarrán-Ponce, 2014). Es por ello que en este trabajo, se emplearon dos grupos de animales expuestos a una dosis de 0.5 Gy de radiación ionizante. El primer grupo se expuso a rayos X mientras que el segundo grupo se expuso a radiación  $\gamma$ . Como fuente de rayos X se empleó un tubo de rayos X marca XYLON modelo SMART 583 perteneciente al Instituto de Física de la UNAM. Para el segundo grupo, se empleó un irradiador Gamacell 1000 que emplea  $^{137}\text{Cs}$  como fuente de radiación  $\gamma$  y que es propiedad del IIB. La energía emitida por el tubo de rayos X fue de aproximadamente 67 keV, mientras que la energía emitida por el  $^{137}\text{Cs}$  fue de aproximadamente 667 keV. Los cálculos correspondientes a la dosis absorbida y la distribución de la misma se llevaron a cabo previamente tanto para la radiación  $\gamma$  (Fajardo-Miranda, 2013), como para los rayos X (Salas-López, 2016).

Antes de ser irradiados, los animales fueron sedados con pentobarbital (75 mg/kg i. p.) y montados en soportes diseñados para mantenerlos inmovilizados y permitir una irradiación de cuerpo completo de la manera más homogénea posible. El grupo expuesto a rayos X se montó con las extremidades extendidas entre dos postes de madera y se alinearon en el centro del campo de radiación con ayuda de un láser óptico (Figura 4). Por su parte, los animales tratados con radiación  $\gamma$  se colocaron dentro de un cilindro de cartón soportado por una base de madera que posteriormente se introdujo en el irradiador (Figura 5). Para obtener la dosis deseada, los individuos tratados con rayos X se expusieron a este tipo de radiación durante  $\approx 5:12$  min. En el caso del tratamiento con radiación  $\gamma$  se empleó un tiempo de exposición de 12 segundos. Los animales empleados como controles fueron

sometidos al mismo estrés que involucra la administración del sedante y la manipulación que implica el tratamiento, aunque se mantuvieron aislados de las áreas de irradiación.

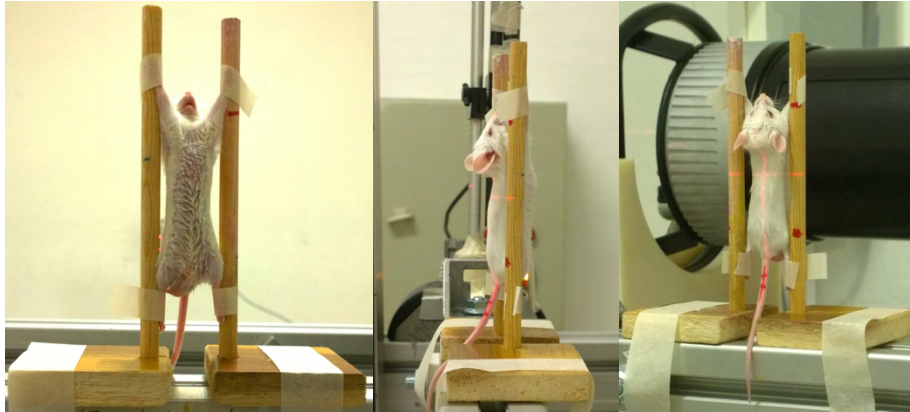


Figura 4. Montaje de los animales en las bases de madera empleadas para su posicionamiento frente al haz de Rayos X.

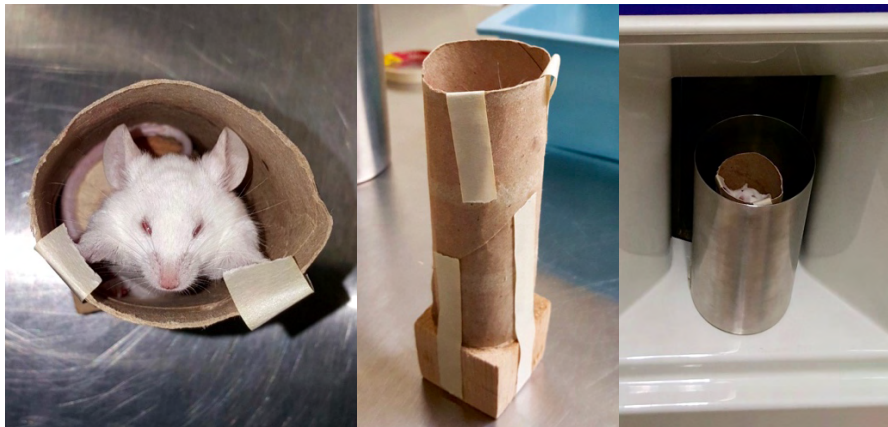


Figura 5. Montaje de los animales en las bases de cartón empleadas para su posicionamiento dentro del irradiador de radiación  $\gamma$ .

### *Sacrificio de los animales y extracción de tejidos*

Para el ensayo curso temporal, se estudió la respuesta a RI en distintos tejidos y en diferentes tiempos posteriores a la irradiación. De manera concreta a 2, 4 y 6 h. Para ello, los animales anestesiados fueron sacrificados por dislocación cervical una vez transcurridos los tiempos mencionados previamente. Se extrajeron el cerebro, el hígado, la médula ósea y los pulmones. A excepción de la médula ósea, cada órgano fue lavado con solución salina (0.9 %, 4° C) y se obtuvo una fracción fresca de tejido con la que inmediatamente se llevó a

cabo la extracción de proteínas. El resto del tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### *Extracción y determinación de proteínas.*

Con la finalidad de realizar ensayos de Western Blot, se homogenizaron los tejidos extraídos conforme al protocolo establecido por Valdovinos-Flores y Gonsebatt (2013). En breve, se homogenizó tejido fresco en solución amortiguadora A (HEPES 10 mM, pH 7.9, KCl 10 mM, DTT 1mM, IGEPAL 0.4% v/v,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1 mM y 10 mg/mL de aprotinina y leupeptina). El homogenado se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 4000 G por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se colectó el sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática, mismo que se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El pellet fue lavado con solución amortiguadora A, lisado y resuspendido con solución amortiguadora C (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 200 nM, EDTA 1 mM, glicerol 5% v/v, DTT 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1mM y 10 mg/mL de aprotinina y leupeptina). Las muestras fueron incubadas en hielo durante 2 h. y centrifugadas a 35,000 G durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al concluir la centrifugación se recuperó la fracción nuclear contenida en el sobrenadante y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras obtenidas, se empleó la técnica de micro-placa de Bradford (Bio-Rad, CA, USA) en la que se empleó una curva patrón de albúmina de suero bovino con  $r^2 \geq 0.99$ .

#### *Ensayo de Western Blot*

Para determinar los cambios de expresión en las proteínas de interés, se empleó la técnica de Western Blot. Se utilizaron proteínas citoplasmáticas para investigar la expresión de proNGF usando a GAPDH como control de carga.

Durante la irradiación con rayos X, se presentaron dificultades en la manipulación de los animales, mismas que derivaron en una alta variabilidad individual en las respuestas inicialmente observadas en este grupo. Para reducir dicha variación, todas las muestras

correspondientes a un mismo tejido dentro de un mismo grupo fueron mezcladas en un homogenado, *e. g.* todas las muestras de cerebro de los animales sacrificados a 2 h. Este procedimiento, al igual que determinación de la expresión de proteínas, se realizó de manera independiente en tres ocasiones.

Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Se cargaron 40 µg de proteína en geles de acrilamida a una concentración de 12%. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad® 162-0115; CA, USA). Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche baja en grasas (Santa Cruz Biotechnology sc-2325; TX, USA) en una concentración al 5% preparada con TBS 1X (Tris pH 7.6, NaCl y Tween 20 [0.1 %]). Después se llevó a cabo la incubación con Anti-NGF (Abcam ab52918; Cambridge, UK) diluido en solución de bloqueo en una concentración de 1:1500. Al terminar la incubación, se hicieron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween. A continuación, las membranas se incubaron con anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology #7074; MA, USA) diluido también en solución de bloqueo en una concentración de 1:2000. Al terminar la incubación, las membranas se sometieron a 3 lavados de 15 min con TBS-Tween y 1 lavado de 15 min con TBS. Las proteínas fueron detectadas a través de una reacción quimioluminiscente en la que se empleó el kit Amersham™ ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (GE Life Sciences, RPN2232; IL, USA) y se usaron placas fotográficas Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Life Sciences, 28-9068-40).

De igual manera, se llevó a cabo la detección de la proteína GAPDH que fue usada como control de carga. Para ello, las membranas se sometieron a *stripping* con NaOH 0.2 M durante 15 min. Al concluir, las membranas se bloquearon de nuevo con Leche Blotto 5% y se incubaron con anti-GAPDH (Merck Millipore MAB374; MA, USA) diluido en solución de bloqueo a una concentración de 1:5000. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-IgG de

ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Thermo-Fisher 61-6520; MA, USA) diluido a una concentración de 1:2000 en solución de bloqueo.

Posteriormente, se hizo un análisis de densitometría de las placas con el software Image J 1.49 (W. Rasband, NIH, USA). La expresión de la proteína problema se expresó en % respecto al control de carga empleado en cada corrida electroforética y revelado para cada membrana.

### *Ensayo de Inmunofluorescencia*

En un grupo adicional de animales expuestos a una dosis de 0.5 Gy de radiación se evaluó el montaje de la respuesta antioxidante mediante ensayos de inmunofluorescencia contra el factor de transcripción Nrf2. Tomando en cuenta la alta heterogeneidad de tipos celulares en el cerebro, se decidió emplear a NeuN como marcador específico de neuronas para evaluar de manera general la distribución de Nrf2 dentro de este órgano. La evaluación se llevó a cabo en el cerebro a un único tiempo de 2 h posteriores a la irradiación de los individuos. Para ello, los ratones fueron perfundidos por vía trans-cardíaca con solución salina (0.9%, 4° C) seguida por paraformaldehído (4%, 4° C) (PFA) disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Posteriormente se extrajo el cerebro y fue post-fijado con la misma solución de paraformaldehído. Los tejidos fueron sumergidos por 24 h en una solución amortiguadora de crio-protección consistente en una solución de sacarosa al 20% y posteriormente al 30%. Se hicieron cortes de 40 µm con criostato y se sumergieron en PFA 4%. Los cortes se sometieron a 3 lavados con PBS + Triton X-100 (0.3%) (PBST), bloqueados con una solución de suero de caballo 10% (Vector Laboratories Y0124; CA, USA). Posteriormente, los cortes se incubaron con Anti-Nrf2 1:200 (Abcam ab31163) y el marcador específico para neuronas Anti-NeuN 1:400 (Merck Millipore MAB377) a 4°C durante una noche. Después, se hicieron 3 lavados con PBS y se llevó a cabo la incubación con anticuerpos secundarios acoplados a AlexaFluor: Burro Anti-Conejo AF546 (Thermo Fisher A10040) y Burro Anti-Ratón AF488 (Thermo Fisher A21202) por 2 horas a temperatura ambiente. Asimismo, se llevó a cabo una contra-tinción de los núcleos con 4,

6 diamino-fenilidol (DAPI) (Thermo Fisher D21490) por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se montaron en laminillas con medio de montaje fluorescente (Agilent Technologies S3023, CA, USA) y se analizaron en microscopio. Se obtuvieron microfotografías por medio de un microscopio confocal Nikon A1R+ (Nikon Instruments, TYO, JAP).

Empleando el software Image J se llevó a cabo el conteo de las células positivas para la marca de Nrf2. Dicho análisis se hizo de manera independiente para cada una de las siguientes regiones: corteza, hipocampo, estriado, tálamo y cerebelo. De igual forma, el conteo se llevó a cabo considerando todo el cerebro.

#### *5.10 Análisis Estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Los datos fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar (D. E.). Para determinar las diferencias en los niveles de expresión, se hicieron pruebas de t de dos colas comparando los controles contra los tratamientos de cada hora. Se consideraron significativas las diferencias en donde  $p \leq 0.05$ .

#### *Ética*

Los experimentos descritos en este trabajo se realizaron siguiendo las normas descritas en "*Principles of Laboratory Animal Care*" (NIH publicación No. 85-23, revisado en 1985) y la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) titulada "*Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*" (Clave NOM-062-ZOO-1999, publicado en agosto 2001).

## RESULTADOS

En el grupo de animales expuestos a rayos X se presentaron cambios significativos en los niveles de pro NGF en todos los tejidos. Particularmente, se observó un incremento en los niveles de la proteína en el pulmón (7%) 4 horas posteriores a la irradiación. Asimismo, se registró el aumento a las 6 horas en el cerebro (15%), el hígado (26%) y el pulmón (12%). Por el contrario, en la médula se puede apreciar una baja en los niveles de la proteína 2 h después de que los animales fueron expuestos a la irradiación (Figura 6).

En lo que respecta al grupo expuesto a radiación  $\gamma$ , se registraron aumentos en los niveles de la proteína únicamente a 2 h en el cerebro (14%) y a 6 h en el pulmón (11%). En cambio, en los tejidos restantes se aprecia una disminución a 2 h en el hígado (14%) y en la médula a 2 (9%), 4 (22%) y 6 (29%) horas. Además, las disminuciones en los niveles de la proteína en este último tejido presentan un comportamiento de tipo tiempo-dependiente (Figura 7).

Debido a que el incremento en NGF observado en el cerebro de los ratones expuestos a radiación  $\gamma$  a las 2 h sugiere la activación de una respuesta antioxidante, se decidió corroborar la activación de esta respuesta a través de inmunofluorescencias contra Nrf2 en este tejido. Además, evaluar la respuesta a la radiación en un órgano tan heterogéneo celularmente, permite obtener una mejor estimación de la radiosensibilidad.

En los ensayos de inmunofluorescencia también se presentó un incremento en los niveles de expresión de Nrf2 en el cerebro de los animales expuestos a radiación  $\gamma$ : se observaron aumentos en la corteza (97%), el tálamo (56%) y el cerebelo (60%). Un análisis considerando al cerebro en su totalidad también arrojó un aumento significativo en el número de células Nrf2-positivas en el grupo tratado (70%) (Figuras 10 - 12). Con excepción del cerebelo, la marca del factor de transcripción se observó principalmente en neuronas, siendo prácticamente nula la expresión en glía (Figuras 13 y 14).

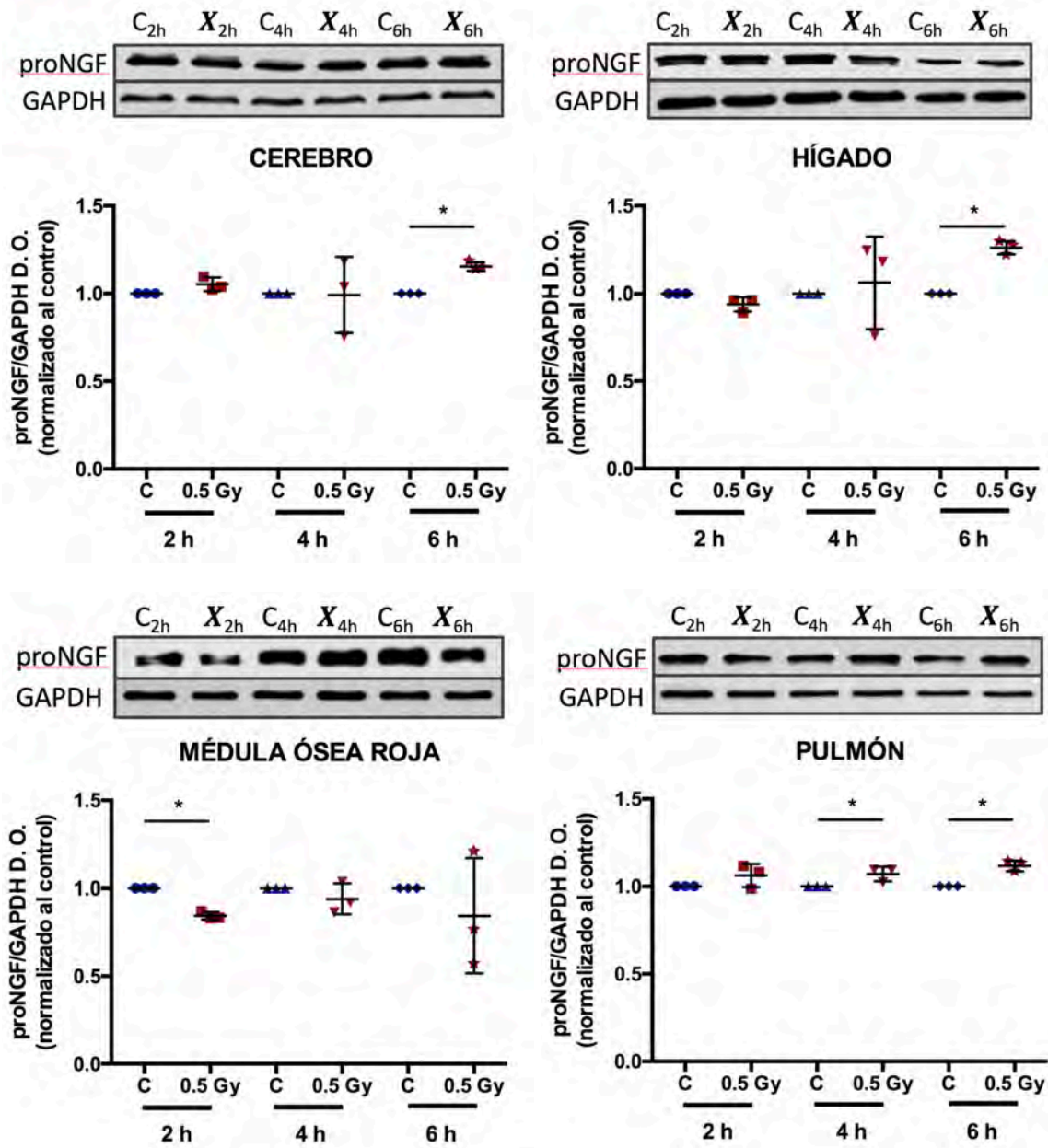


Figura 6. Modulación de la expresión de NGF en cerebro, hígado, médula y pulmón de ratones Balb/c expuestos a 0.5 Gy de rayos X. Los valores representan la media  $\pm$ D. E. El análisis de los datos se hizo mediante una prueba de t de dos colas. \* =  $p \leq 0.05$ . C = controles; X = expuestos a rayos X.



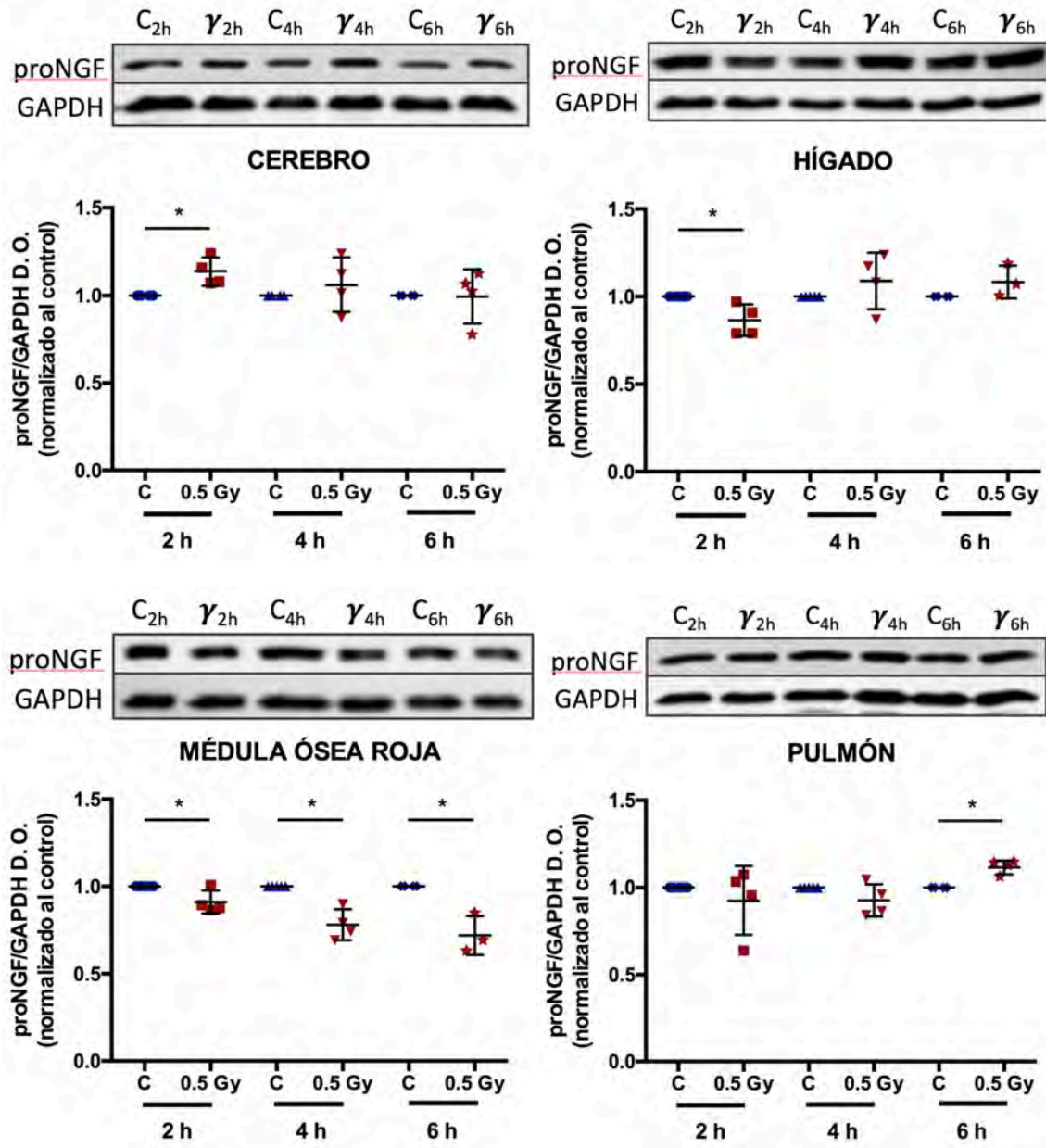


Figura 7. Modulación de la expresión de NGF en cerebro, hígado, médula y pulmón de ratones Balb/c expuestos a 0.5 Gy de radiación  $\gamma$ . Los valores representan la media  $\pm$  D. E. El análisis de los datos se hizo mediante una prueba de t de dos colas. \* =  $p \leq 0.05$ . C = controles;  $\gamma$  = expuestos a radiación  $\gamma$ .

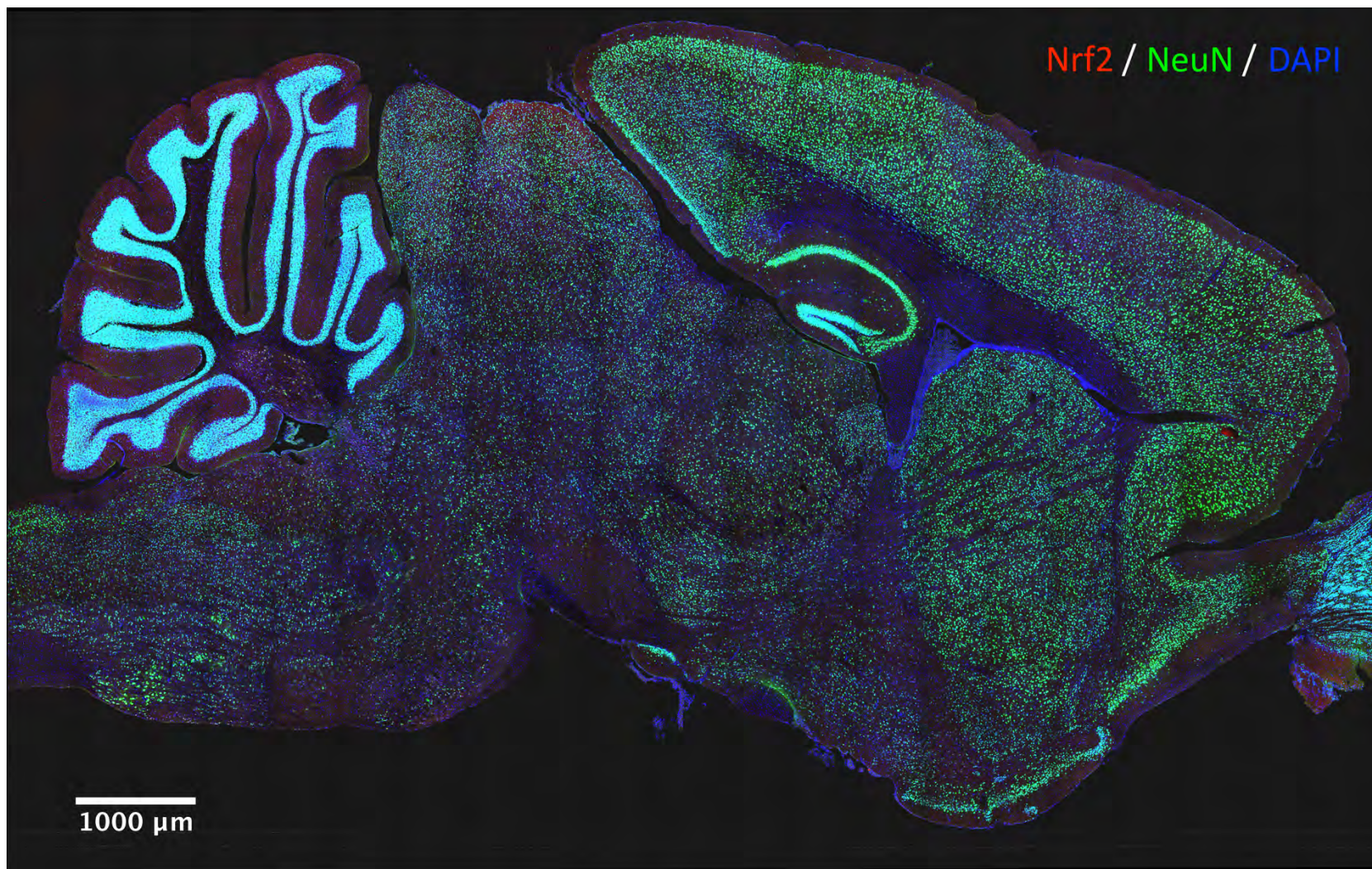


Figura 8. Fotomicrografía compuesta representativa de inmunofluorescencia en cerebro de ratones Balb/c. La imagen corresponde al grupo control. Se observan las marcas de Nrf2 en rojo, el marcador neuronal NeuN en verde y la marca de núcleos con DAPI en azul.

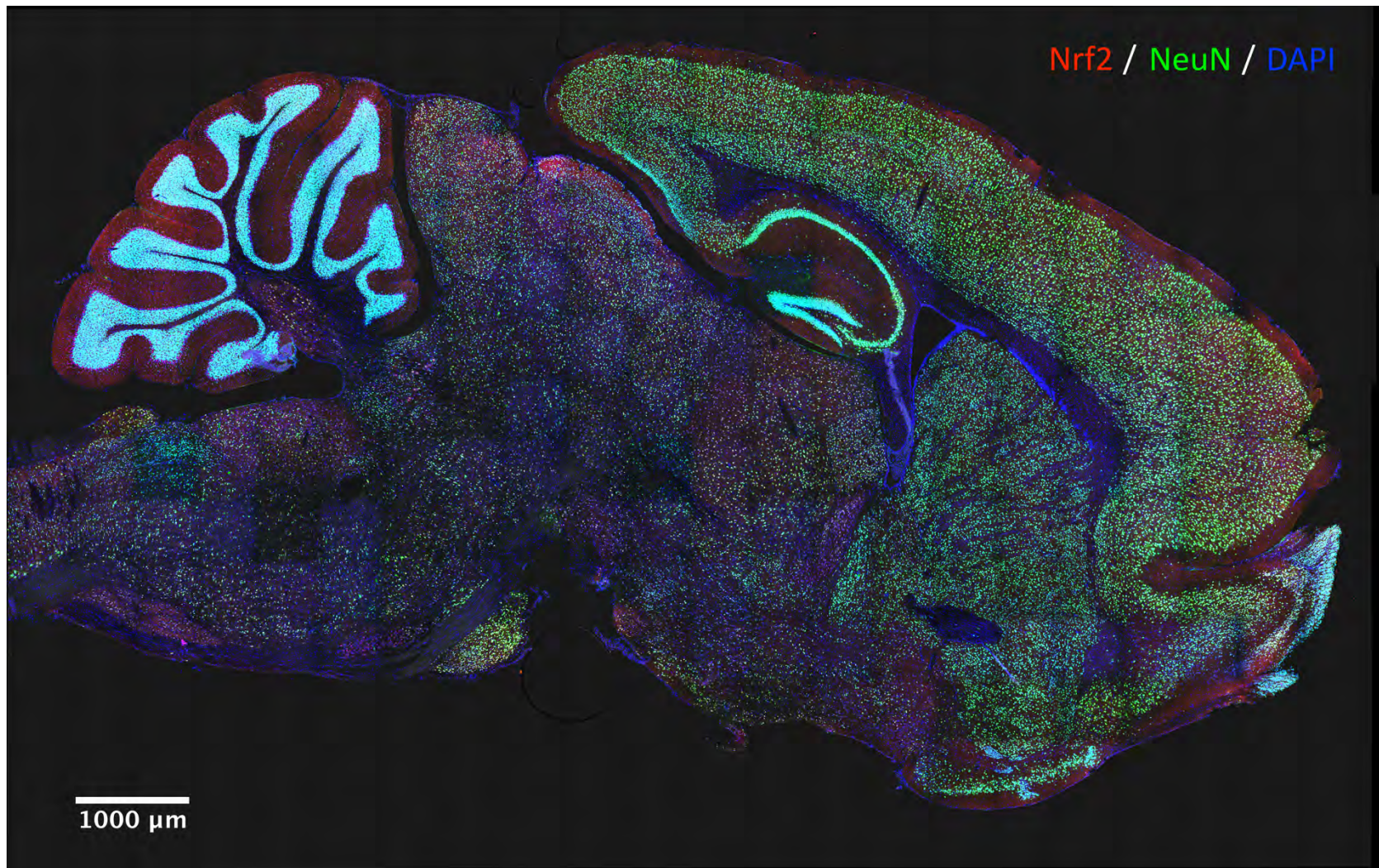


Figura 9. Fotomicrografía compuesta representativa de inmunofluorescencia en cerebro de ratones Balb/c. La imagen corresponde al grupo expuesto a una dosis de 0.5 Gy de radiación  $\gamma$ . Se observan las marcas de Nrf2 en rojo, el marcador neuronal NeuN en verde y la marca de núcleos con DAPI en azul.

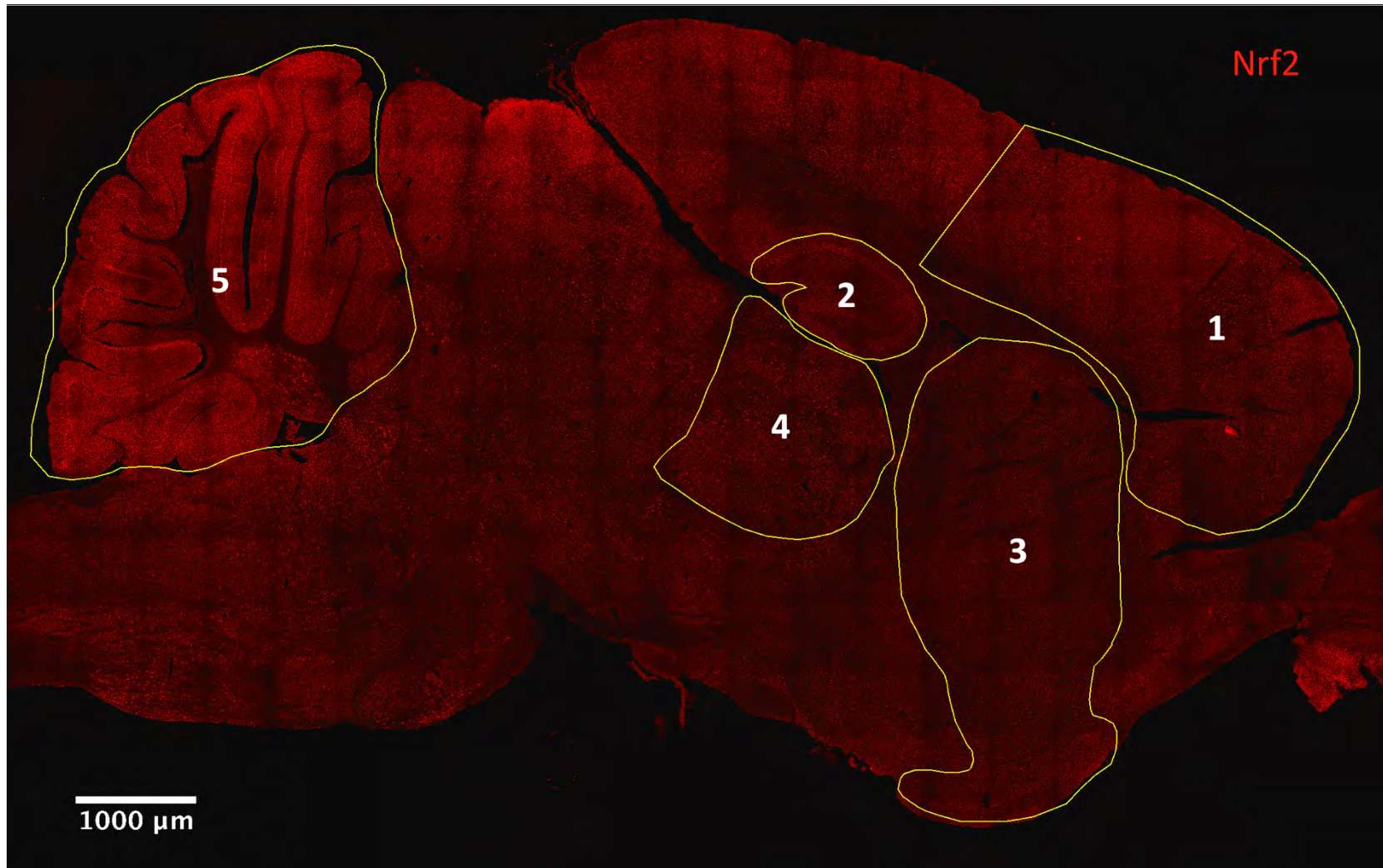


Figura 10. Fotomicrografía compuesta representativa de inmunofluorescencia en cerebro de ratones Balb/c. La imagen corresponde al grupo control. Se observa únicamente la marca de Nrf2 con fines de evidenciar los cambios de expresión en esta proteína. Las áreas delimitadas con líneas amarillas corresponden a las regiones analizadas: corteza (1), hipocampo (2), estriado (3), tálamo (4) y cerebelo (5).

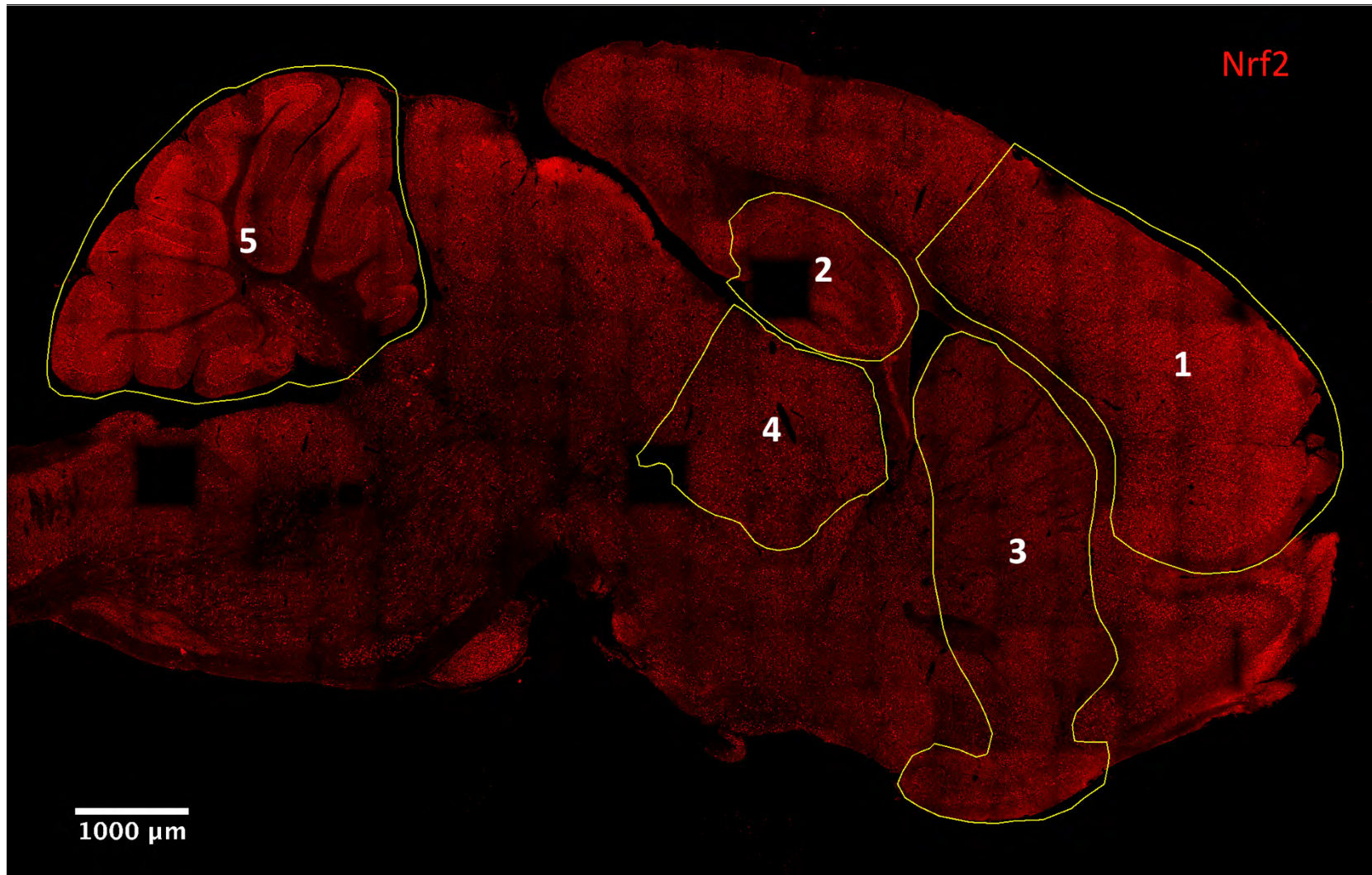


Figura 11. Fotomicrografía compuesta representativa de inmunofluorescencia en cerebro de ratones Balb/c. La imagen corresponde al grupo expuesto a una dosis de 0.5 Gy de radiación  $\gamma$ .. Se observa únicamente la marca de Nrf2 con fines de evidenciar los cambios de expresión en esta proteína. Las áreas delimitadas con líneas amarillas corresponden a las regiones analizadas: corteza (1), hipocampo (2), estriado (3), tálamo (4) y cerebelo (5).

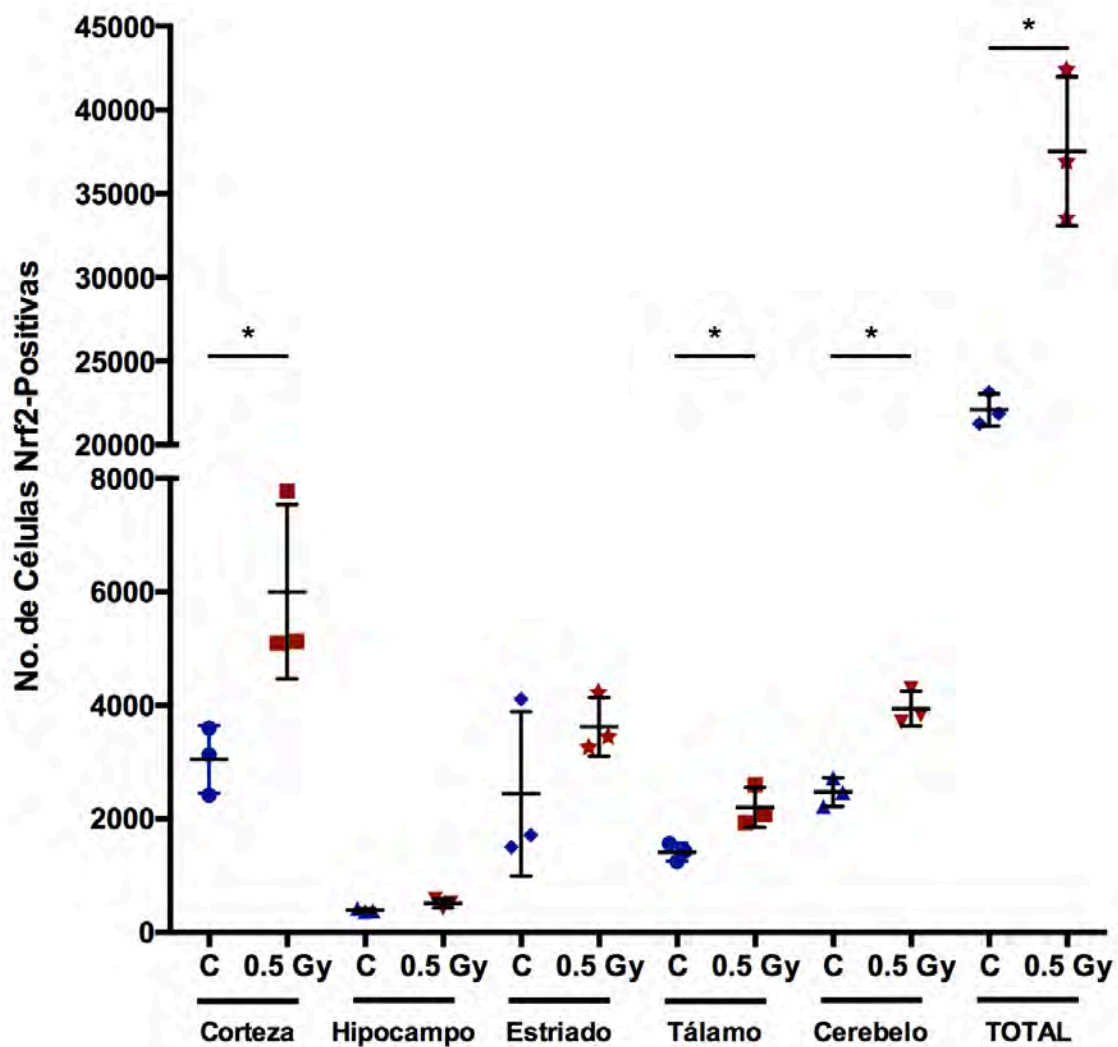


Figura 12. Modulación de la expresión de Nrf2 en diferentes regiones de cerebro de ratones Balb/c tratados con 0.5 Gy de radiación  $\gamma$ . Los datos se presentan como media  $\pm$  D. E. El análisis de los datos se hizo mediante una prueba de t de dos colas. \* =  $p \leq 0.05$ .

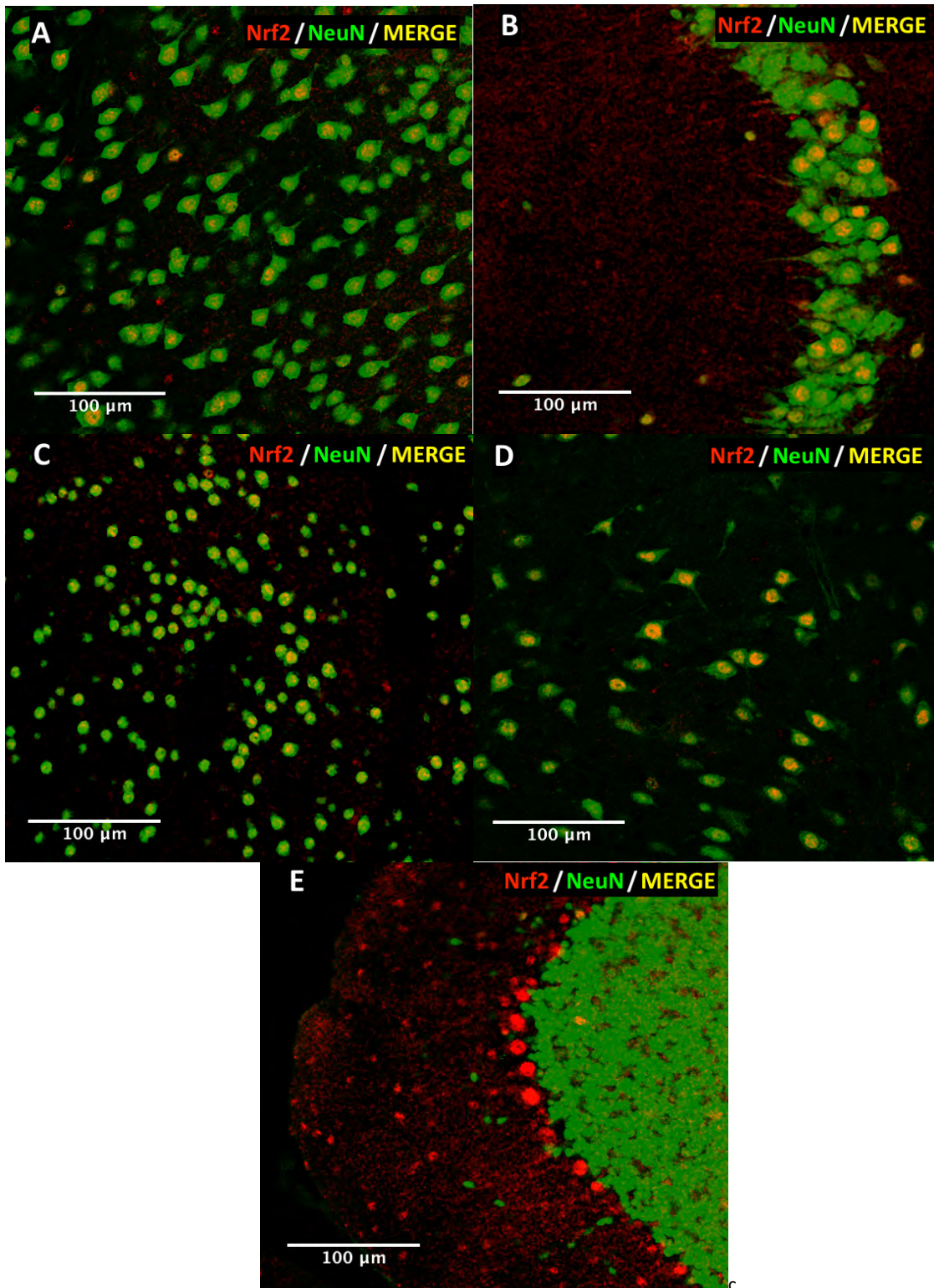


Figura 13. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia contra Nrf2 en corteza (A), hipocampo (B), estriado (C), tálamo (D) y cerebelo (E) de ratones Balb/c pertenecientes al grupo control.

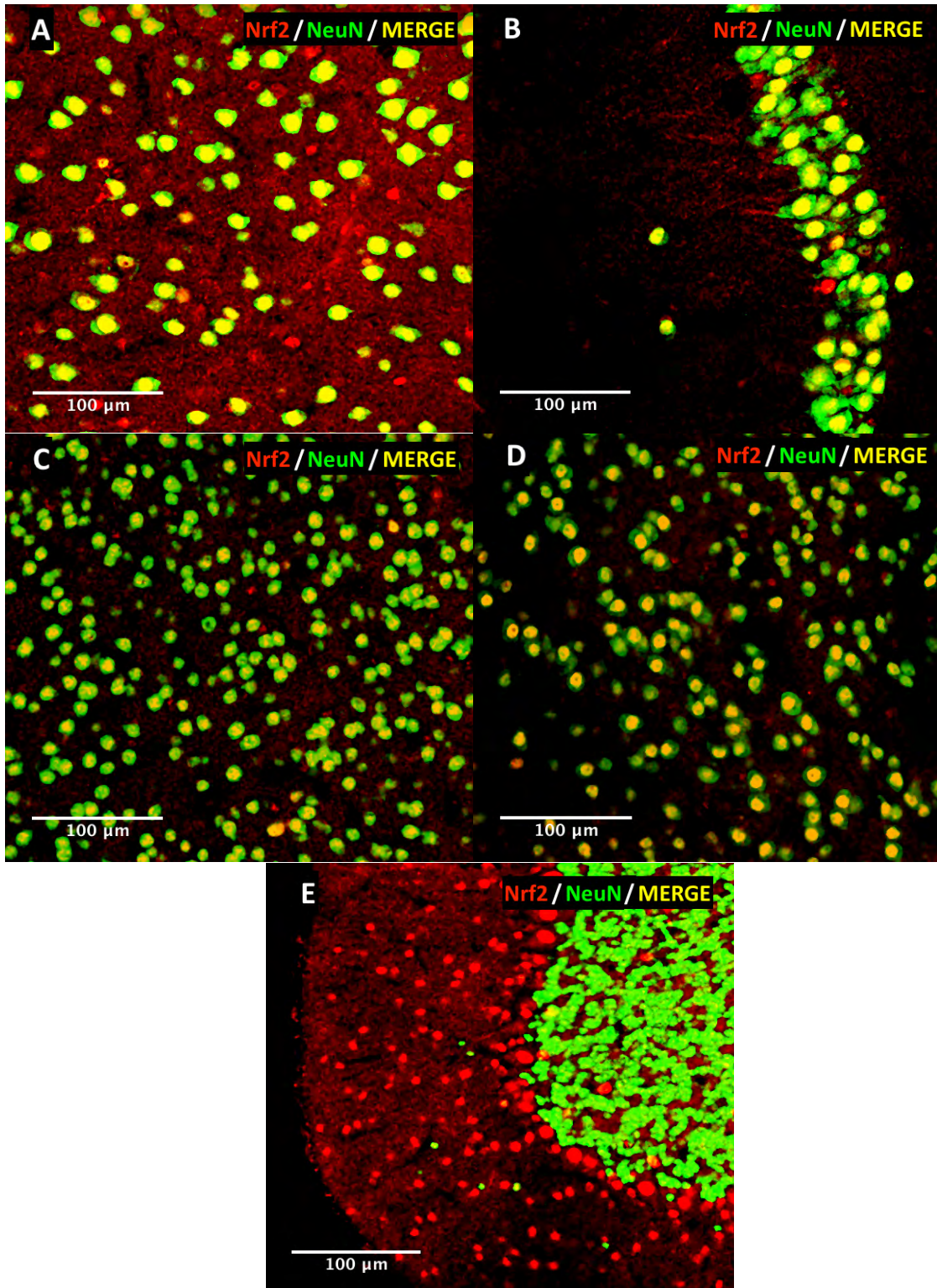


Figura 14. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia contra Nrf2 en corteza (A), hipocampo (B), estriado (C), tálamo (D) y cerebelo (E) de ratones Balb/c pertenecientes al grupo tratado con 0.5 Gy de radiación  $\gamma$ .



## DISCUSIÓN

La radiación ionizante daña a los organismos principalmente a través de la generación de radicales HO• (Halliwell, 1994, 2001; Azzam, 2012). Partiendo del hecho anterior, la capacidad para montar una respuesta antioxidante es importante en individuos involucrados en este tipo de interacciones. En este sentido, el GSH juega un papel importante en la protección contra la radiación ionizante, pues cuenta con una alta eficiencia para reducir al radical HO• (Yadav y Mishra, 2013). Considerando además que NGF es capaz de modular la síntesis y los niveles de GSH (Pan y Pérez-Polo, 1993), resultaría importante entender la participación de esta neurotrofina en la respuesta a la radiación ionizante. Aunado a estos hechos, los efectos producidos por la radiación ionizante en los sistemas biológicos pueden variar dependiendo del nivel de radio-sensibilidad del tejido irradiado (Bergonié y Tribondeau, 2003; Alcaraz-Baños, 2003).

Con base en lo anterior, es probable que la modulación de NGF observada en los grupos expuestos tanto a rayos X como a radiación  $\gamma$  pudiera estar involucrada en el montaje de una respuesta antioxidante por parte de los tejidos estudiados. Cabe resaltar que proNGF es la forma en que esta neurotrofina se encuentra de manera predominante en el SNC (Fahnestock *et al.*, 2001). Es por ello que en este trabajo, las estimaciones de los niveles de este factor de crecimiento se hicieron a través de la forma inmadura.

De manera particular, en el grupo expuesto a rayos X se pudo observar un incremento en los niveles de proNGF en todos los tejidos excepto en la médula. Este hecho estaría relacionado con la radiosensibilidad específica de cada tejido. De esta manera, es posible que en el cerebro, el hígado y el pulmón se esté montando una respuesta antioxidante en respuesta al daño oxidante generado por los radicales HO• producidos por la radiación.

Dicha respuesta se presenta preferentemente a las 6 h post-irradiación probablemente porque los daños oxidantes podrían acumularse en tiempos más

prolongados. Aunque Yamaoka *et al.* (1991) no observaron cambios en los niveles de SOD en cerebro e hígado de ratones a 4 h post-irradiación con 0.5 Gy de rayos X, si observaron una tendencia a incrementar en los niveles de la enzima. En este trabajo tampoco se observaron cambios en proNGF a 4 h en estos mismos tejidos, no obstante, se presentó un aumento en los niveles de la proteína a 6 h. Es posible que en animales expuestos específicamente a rayos X, la cinética de la generación de daño sea diferente porque la emisión de energía es menor y el tejido puede requerir de un mayor tiempo post-irradiación para que el daño se “acumule” y se pueda evidenciar la activación de una respuesta antioxidante.

En lo que respecta al pulmón, ya se ha demostrado que es un tejido más radiosensible que el cerebro (Lee *et al.*, 2006). Además, en los resultados obtenidos por Mohamed *et al.* (2014) se observó que la exposición a 100  $\mu$ Gy de rayos X produce una baja en los niveles de GSH en los pulmones, a la vez que en el cerebro se inicia una respuesta antioxidante. Aunado a esto, Yamaoka *et al.* (1991) tampoco observaron diferencias en los niveles de enzimas antioxidantes en este mismo tejido ni siquiera en animales expuestos a dosis muy altas de radiación (> 5 Gy). Si bien el incremento observado a 4 h es modesto (7%), es interesante que en este tejido la respuesta a la radiación se inició en un menor tiempo que en el cerebro y el hígado. Hasta donde tenemos conocimiento, nuestro trabajo es el primero en presentar evidencias de la posible activación de una respuesta antioxidante en pulmones expuestos a rayos X.

En el caso de la médula, la baja en los niveles de la neurotrofina podría relacionarse la alta radiosensibilidad de este tejido (Suciu, 1983). En un modelo *in vitro*, Braunstein *et al.* (2009) demostraron que los mecanismos de síntesis de proteínas se encuentran inhibidos en células radio-sensibles expuestas a radiación ionizante. Por lo tanto, es posible que en la médula, la exposición a radiación ionizante también induzca daños en estos mismos mecanismos, razón por la cual se observa la baja en los niveles de NGF en este tejido.

Es importante mencionar que no se observaron cambios en los niveles de mRNA de NGF en ninguno de los tejidos estudiados (Salas-López, 2016). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la regulación de NGF por radiación ionizante sea a través de un mecanismo traduccional.

Por otro lado, en el grupo expuesto a radiación  $\gamma$ , se observó que los niveles de proNGF sólo se incrementan en el cerebro a 2 h, mientras que los niveles de la proteína bajan a este mismo tiempo en el hígado. Previamente, se ha demostrado que la exposición a 0.5 Gy de radiación  $\gamma$  puede inducir aumentos en los niveles de GSH tanto en el cerebro como en el hígado. Estos efectos se han estudiado con mayor profundidad y se ha demostrado que la RI induce la expresión de la  $\gamma$ -GCS entre 0.5 y 2 h posteriores a la irradiación con una baja a 3 h y un posterior incremento a las 6 h en cerebro (Kojima *et al.*, 1998b). En el hígado, esta misma enzima presenta una baja a 1 hora y un incremento tiempo dependiente a las 3 y 6 h (Kojima *et al.*, 1998a).

Aunado a lo anterior, también hay publicaciones en las que NGF tiene la capacidad de inducir a las enzimas involucradas en la síntesis de GSH (Pan y Pérez-Polo, 1993). Es posible que, en nuestro trabajo, la inducción de proNGF a 2 h en el cerebro esté relacionada con la iniciación de una respuesta antioxidante a través de la inducción de la síntesis del glutatión, misma que se perdería a 4 h y 6 h. En el caso del hígado, es posible que la baja en proNGF esté relacionada con la inhibición de los mecanismos de síntesis de GSH, mismos que posteriormente se podrían iniciar como indican la recuperación de los niveles de proNGF a niveles del control a 4 y 6 h.

La radiación  $\gamma$  también fue capaz de inducir un aumento en los niveles de proNGF en el pulmón, específicamente a 6 h. En otros trabajos se ha demostrado que el pulmón tiene una menor capacidad para activar una respuesta antioxidante contra la radiación en comparación con el cerebro y el hígado (Yamaoka *et al.*, 1991; Avti *et al.*, 2005). Esta aparente incapacidad podría estar relacionada con la respuesta retrasada del pulmón en

comparación con el cerebro y el hígado. A pesar de que no podemos determinar por qué este tejido parece responder más lentamente, es importante resaltar que nuevamente se presentan evidencias de una respuesta antioxidante ante un estímulo por RI.

Finalmente, en la médula, de nuevo se aprecia evidencia de la radio-sensibilidad del tejido, pues los niveles de proNGF bajan de manera tiempo-dependiente. Nomura *et al.* (1992) demostraron que en tejidos radio-sensibles que forman parte del sistema linfático como el bazo y el timo, la exposición a RI induce una baja en la sobrevivencia celular, misma que incrementa conforme avanza el tiempo. Es posible entonces, que las bajas en los niveles de proNGF observadas en la médula, se deban a que en este tejido se están iniciando mecanismos de muerte celular conforme el tiempo post-irradiación se vuelve más prolongado.

Tomando en consideración que el cerebro mostró evidencias de una posible respuesta antioxidante 2 horas después del tratamiento de radiación  $\gamma$ , se decidió llevar a cabo ensayos de inmunofluorescencia para otra proteína que participa en esta vía en este tejido. La decisión anterior también surgió debido a que el cerebro es un tejido compuesto por tipos celulares bastante heterogéneos y al estudiarlo, se podrían generar mejores impresiones sobre el concepto de radiosensibilidad.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia en cerebro de ratones parecen confirmar la activación de la respuesta antioxidante como consecuencia de la exposición a radiación ionizante. Esta aseveración parte del hecho de que el factor de transcripción Nrf2 es considerado como el mayor mecanismo antioxidante presente en las células (Kobayashi y Yamamoto, 2006). Ya se ha demostrado que la exposición a RI puede inducir la respuesta antioxidante a través de la vía de Nrf2 en un modelo *in vitro* (McDonald *et al.*, 2010). Incluso se ha sugerido que Nrf2 puede promover la sobrevivencia en distintos tipos celulares irradiados ya sea por medio de vías antioxidantes o por la regulación de vías inflamatorias (Revisado por Sekhar y Freeman, 2015). Por consiguiente, se podría concluir

que Nrf2 podría jugar un papel fundamental en los mecanismos de protección contra la radiación ionizante.

Lo anterior adquiere relevancia al considerar que 2/3 partes del daño producido por la RI es consecuencia directa de la acción de radicales HO•, cuya generación deriva en estrés oxidante. En el presente trabajo, se observó un incremento en la expresión de Nrf2 en el cerebro de ratones Balb/c como consecuencia de la exposición a 0.5 Gy de radiación  $\gamma$ , lo que sugiere su participación en la defensa contra las ROS producidas por la RI. A pesar de este aumento general en la expresión, es importante notar que no todas las regiones del cerebro mostraron el mismo comportamiento ante el estímulo producido por la exposición a la radiación. La amplia diversidad en las formas y funciones de las neuronas presentes en el cerebro resulta en variaciones en la vulnerabilidad entre las diferentes regiones cerebrales (Revisado por Wang y Michaelis, 2010).

Lo anterior ya ha sido demostrado en diversos trabajos, en los que se ha estudiado la capacidad de respuesta de diferentes regiones ante diversos estímulos pro-oxidantes. Dentro de dichos estudios, se ha evidenciado que el hipocampo y el cuerpo estriado responden de manera menos favorable ante el incremento de pro-oxidantes derivado del envejecimiento (Hussain *et al.*, 1995; Siqueira *et al.*, 2005) o eventos de isquemia-reperfusión (Candelario-Jalil *et al.*, 2001). A su vez, la corteza y el cerebelo también pueden ser afectados por agentes oxidantes, aunque también suelen combatir de manera más eficiente este tipo de retos. Esta aseveración queda demostrada en diferentes modelos que incluyen inducción de daño oxidante por envejecimiento (Hussain *et al.*, 1995; Siqueira *et al.*, 2005) o por exposición a tolueno (Kodavanti *et al.*, 2011) y tungstato de sodio (Sachdeva *et al.*, 2015). Igualmente, el tálamo y el hipotálamo tienen una alta capacidad para combatir el daño producido por diferentes inductores de estrés oxidante (Pang *et al.*, 2013; Mitra *et al.*, 2014).

Si bien, este es el comportamiento general de estas regiones ante este tipo de estrés, también se han observado respuestas más homogéneas ante un mismo estímulo. Un ejemplo de ello se observa en un modelo de exposición a cadmio, en el que se incrementan los niveles de Nrf2 en la corteza, el hipocampo, el estriado y el cerebelo, siendo este último el que muestra la mejor respuesta ante el estímulo (Montes *et al.*, 2015).

Por último, también existen estudios que prueban que se pueden observar comportamientos diferentes a los antes mencionados. Como prueba, se ha demostrado que el hipocampo tiene una menor cantidad de oxidaciones en el DNA, mientras que la corteza y el cerebelo no sólo desarrollan más lesiones, sino que también tienen una menor tasa de reparación de las mismas (Cardozo-Peláez *et al.*, 1999; 2000).

En nuestro trabajo, las diferencias en la respuesta a RI entre las distintas regiones se presentaron como incrementos evidentes en la expresión de Nrf2 en la corteza, el tálamo y el cerebelo, mientras que el hipocampo y el cuerpo estriado no mostraron cambios significativos.

Aunque estas últimas dos regiones no mostraron cambios, ya ha quedado de manifiesto que son consideradas como sensibles al daño por oxidantes. El grupo de Cardozo-Peláez *et al.* (1999) demostró que el estriado es una de las regiones más susceptibles a acumular lesiones oxidantes en el DNA como consecuencia del envejecimiento. De igual forma, el cuerpo estriado suele ser gravemente afectado por el cloruro de tributilina en comparación con otras regiones como el cerebelo o el hipotálamo (Mitra *et al.*, 2014). Del mismo modo, el hipocampo se considera como una de las regiones más susceptibles a daño oxidante (Hussain *et al.*, 1995; Candelario-Jalil *et al.*, 2001) y al daño generado por RI (Nagai *et al.*, 2000). De no ser reparado, el daño oxidante puede resultar en la inducción de la respuesta apoptótica (Chandra *et al.*, 2000). En consecuencia, tanto el hipocampo como el estriado podrían ser consideradas como regiones

relativamente radiosensibles, pues la ausencia de una respuesta por parte de Nrf2 implicaría un mayor daño oxidante asociado a la posibilidad de muerte celular.

Por el contrario, los aumentos de Nrf2 observados en corteza, tálamo y cerebelo denotarían una mayor resistencia a los oxidantes producidos específicamente por la RI, lo cual podría traducirse en una mayor radiorresistencia. En diversos estudios, se ha demostrado que estas regiones suelen contar con una mejor respuesta ante el estrés oxidante. En un estudio realizado por Kodavanti *et al.* (2011), se demostró que tanto la corteza como el cerebelo cuentan con una mayor capacidad antioxidante contra el estrés oxidante producido por tolueno. De manera similar, se ha propuesto que el tálamo cuenta con un mayor potencial antioxidante basal en comparación con las demás regiones (Pang *et al.*, 2013). Por lo tanto, no resulta sorprendente que estas tres regiones muestren evidencias de una respuesta antioxidante ante la exposición a radiación  $\gamma$ . Más aún, dentro de estas mismas regiones también se presentan diferencias que sugieren que la corteza sería la región más resistente, considerando que su cambio en los niveles de Nrf2 se encontraron por encima del tálamo y el cerebelo.

Tomando en consideración las evidencias de este trabajo y trabajos anteriores, se podría concluir que: i) cada una de las regiones del cerebro responde de manera diferente a insultos oxidantes; ii) dichas respuestas también varían dependiendo del mecanismo a través del cual se produjo el estrés oxidante; iii) de manera general el hipocampo y el estriado son las regiones más susceptibles al daño oxidante. Así pues, las diferencias presentes en estas respuestas se podrían considerar como una prueba de que también se pueden presentar variaciones en la radiosensibilidad dentro un mismo tejido.

Por su parte, el análisis cualitativo de la distribución celular en la expresión de Nrf2 arrojó resultados interesantes. Se ha documentado que, en el cerebro, este factor de transcripción se expresa principalmente en los astrocitos, mientras que la expresión en neuronas suele ser muy baja (Revisado por Baxter y Hardingham, 2016). Este hecho

contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo en donde se observó que la marca de Nrf2 se presenta principalmente en tipos celulares neuronales. A pesar de este hecho, Tanaka *et al.* (2011) evaluaron la localización del factor de transcripción en astrocitos, microglia y neuronas de ratones, y observaron su expresión únicamente en el último de estos tipos celulares. De igual modo, el grupo de Yan *et al.* (2009) demostró la expresión de Nrf2 tanto en astrocitos como en neuronas de ratones sometidos a lesiones por trauma cerebral. Por lo tanto, es factible que pudiéramos mostrar que la exposición a radiación  $\gamma$  induce la expresión de Nrf2 únicamente en las neuronas. Ello, como un mecanismo de protección específico para un tipo celular particularmente susceptible al estrés oxidante. Es importante mencionar que las microfotografías obtenidas se obtuvieron superponiendo cerca de 250 imágenes obtenidas en un aumento de 20X, un poder de resolución que se podría considerar relativamente bajo. Además, en nuestro estudio no se emplearon marcadores para identificar células de la neuroglia. Por lo anterior, es posible que se esté llevando a cabo una subestimación de la expresión de Nrf2 en la astrogliá y una sobrestimación de la expresión en neuronas.

Previamente se ha observado que una exposición a 0.5 Gy de rayos X no induce cambios en los niveles de mRNA de NGF ni de Nrf2 en el cerebro (Salas-López, 2016). Por lo tanto, es posible que la modulación de la vía antioxidante antes mencionada no implique directamente aumentos en la transcripción de estas proteínas sino más bien una interacción entre las vías de señalización de ambas.

Analizando de manera integral nuestros resultados, resulta interesante que, en el cerebro, se presenten incrementos en la expresión tanto de NGF como de Nrf2 a un tiempo de 2 h post-irradiación. Este hecho podría sugerir que, al menos en el cerebro, existe una respuesta antioxidante que combate los daños producidos por la exposición a radiación ionizante. El hecho de que tanto NGF como Nrf2 se encuentren aumentados podría implicar que ambas proteínas participan en la misma vía de señalización a través de la cual se activa dicha respuesta.



La aseveración anterior también se ve respaldada por diversos estudios en los que se ha evidenciado la relación entre NGF y Nrf2 como parte de una misma cascada de señalización para combatir los daños oxidantes en las células. Específicamente, en modelos *in vitro* se ha demostrado que Nrf2 participa en la inducción de NGF ante la administración de ácido carnosíco (Mimura *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha observado que NGF es capaz de inducir los niveles de Nrf2 en células PC12 (Kosaka *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, la actividad de Nrf2 puede ser inducida por medio de fosforilaciones producidas por diversas cinasas tales como: Erk, PKC, PI3K o Akt (Königsberg-Fainstein, 2007; Li *et al.*, 2012; Turpaev, 2013). Cabe indicar que NGF puede inducir la activación de vías de señalización en las que participan todas estas cinasas (Sofroniew, 2001; Reichardt, 2006). Más aún, existen evidencias que demuestran que la respuesta antioxidante de NGF se alcanza a través de la señalización por Akt (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013). También se ha indicado que Akt también juega un rol importante en la inducción de la vía antioxidante por parte de Nrf2 (Salazar *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2017). Por último, existen estudios que han probado que NGF puede inducir tanto la expresión como la actividad de la enzima HO-1 por una vía de señalización en la que Nrf2 está involucrado (Sun *et al.*, 2017), específicamente a través de la vía de PI3K/Akt (Salinas *et al.*, 2003).

A pesar de todas las evidencias enumeradas anteriormente, es importante resaltar que la relación entre estas dos proteínas y la regulación de la vía de señalización en la que participarían no ha sido dilucidada por completo y prácticamente no existen trabajos acerca de este tema. Por lo tanto, con base en una revisión bibliográfica sobre los efectos de la RI, se propone un posible mecanismo para la señalización de NGF y Nrf2.

Dentro de las señales que pueden modular los niveles de NGF, la familia de factores de transcripción AP-1, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la familia de receptores parecidos a Toll (TLR por sus siglas en inglés) podrían jugar un papel importante en la inducción de esta neurotrofina por la radiación. Estas observaciones surgen del hecho de que proteínas

de la familia AP-1, tales como c-Jun o c-Fos, son capaces de inducir la transcripción de NGF (Hengerer *et al.*, 1990; Jehan *et al.*, 1993) mediante su interacción con un sitio específico para AP-1 presente río arriba en el promotor de este factor de crecimiento (Colangelo *et al.* 1996). Asimismo, se ha demostrado que la activación del receptor TLR2 puede inducir la expresión de NGF a través de un mecanismo que implica la participación de NF- $\kappa$ B (Krock *et al.*, 2016).

Los hechos anteriores adquieren relevancia debido a que se ha observado que la exposición a la radiación es capaz de inducir la actividad de los receptores de tipo TLR, misma que deriva en la activación de NF- $\kappa$ B (Ratikan *et al.*, 2015). De igual manera, la exposición a la RI puede promover la activación de NF- $\kappa$ B y de miembros de AP-1 a dosis tan bajas como 0.5 Gy y en tiempos tan cortos como 30 minutos (Criswell, *et al.*, 2003). Todas estas señales tienen como resultado la iniciación de una respuesta inflamatoria como consecuencia de la exposición a la radiación (Criswell *et al.*, 2003). Por tanto, es posible que, en nuestro modelo, la exposición a RI induzca una respuesta pro-inflamatoria a tiempos cortos post-irradiación que tengan como consecuencia un incremento en los niveles de NGF modulados por la acción de NF- $\kappa$ B y AP-1.

En lo que se refiere al aumento en los niveles de Nrf2 que se observó en este trabajo, es posible que una vez que la inflamación ha inducido la expresión de NGF, sea éste, quien a su vez promueva la actividad de Nrf2. No obstante, es posible que la respuesta antioxidante iniciada por Nrf2 también sea resultado de la actividad de NF- $\kappa$ B. Esta aseveración parte del hecho de que existen evidencias que prueban que Nrf2 cuenta con propiedades anti-inflamatorias a través de la inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B (Cuadrado *et al.*, 2014). Ya se ha sugerido antes que Nrf2 y NF- $\kappa$ B interactúan de manera antagónica y que cuando ambas señales se activan, generalmente NF- $\kappa$ B tiene prioridad en la señal (Wardyn *et al.*, 2015). Este hecho tiene sentido tomando en cuenta que existe un sitio de unión para NF- $\kappa$ B en la secuencia del promotor y el exón 1 del gen de *nrf2* (Rushworth *et al.*, 2012). Además, se ha sugerido que la activación de Nrf2 por parte de NF- $\kappa$ B es parte de

un asa de retroalimentación negativa inducida por la propia actividad de NF- $\kappa$ B como parte del control de la respuesta inflamatoria (Cuadrado *et al.*, 2014; Wardyn *et al.*, 2015). Finalmente, se ha propuesto que la exposición a RI induce la generación de moléculas nocivas conocidas como DAMPs (damage-associated molecular patterns) que fungen como señales para activar a los receptores TLR, que a su vez inducen la vía de NF- $\kappa$ B, la cual finalmente deriva en la activación de Nrf2 (Ratikan *et al.*, 2015).

Así pues, existe la posibilidad de que, en nuestro modelo, las respuestas iniciadas por la exposición a radiación ionizante se presenten de la siguiente manera en el cerebro (Figura 15):

1. La exposición a RI induce la generación de ROS y DAMPs. Estas últimas, estimularán la activación de receptores de tipo TLR.
2. Los receptores TLR promoverán la generación de una respuesta inflamatoria a través de NF- $\kappa$ B. Al mismo tiempo, los receptores TLR también inducirán la expresión de miembros de la familia AP-1 como c-Fos y c-Jun.
3. A través de la actividad de NF- $\kappa$ B y de AP-1, se incrementará la transcripción de NGF.
4. Al mismo tiempo, NF- $\kappa$ B promoverá la transcripción de Nrf2 como parte del asa de retroalimentación negativa para su propia regulación.
5. Las ROS producidas por la RI permitirán la degradación de Keap1 y la activación de Nrf2.
6. NGF iniciará su actividad antioxidante por medio de la activación de Nrf2 a través de la vía PI3K/Akt.
7. Nrf2 promoverá la transcripción de genes antioxidantes para combatir el daño generado por las ROS producidas por la RI.

De este modo, nuestros resultados apuntan a la inducción de una vía antioxidante como respuesta ante los daños producidos por la exposición a radiación  $\gamma$ .

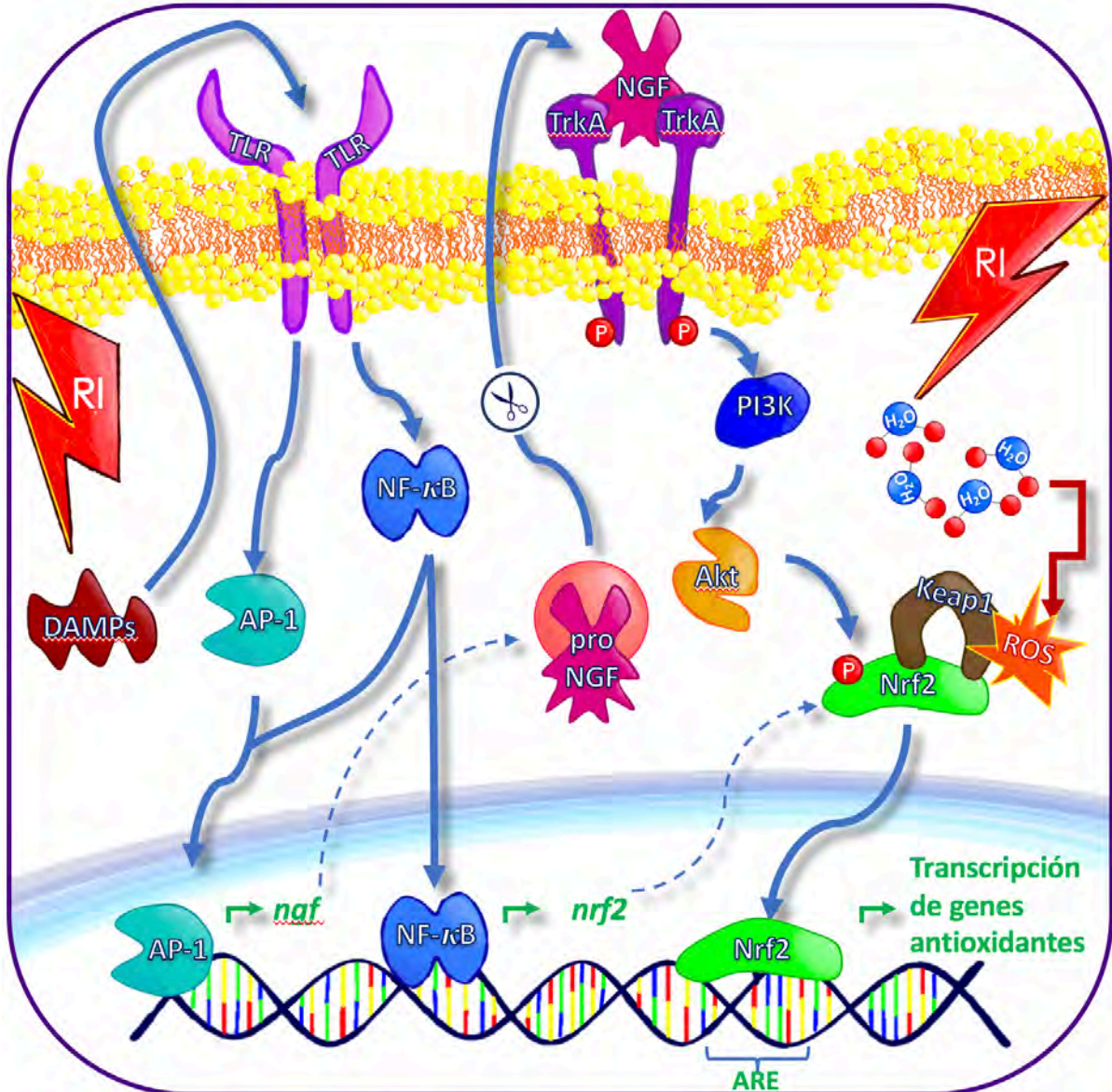


Figura 15. Posible mecanismo de interacción entre NGF y Nrf2. La radiación ionizante (RI) genera ROS y DAMPs, las últimas promoverán la activación de receptores TLR. Dichos receptores activarán a los factores de transcripción AP-1 y NF-κB, que de manera conjunta inducirán la transcripción de NGF. Al mismo tiempo, NF-κB favorecerá la transcripción de Nrf2. La presencia de ROS provocará la degradación de Keap 1, facilitando así la actividad de Nrf2. NGF a través de la vía TrkA/PI3K/Akt, potenciará la actividad de Nrf2 por medio de la fosforilación de éste. Nrf2 inducirá la transcripción de genes antioxidantes que combatirán el daño oxidante producido por la RI.

## **CONCLUSIONES**

La RI es capaz de modular vías de señalización antioxidante a través de NGF y Nrf2, la magnitud de esta modulación es dependiente del tipo celular irradiado.

A excepción del pulmón, las respuestas a RI corresponden con el grado de radiosensibilidad previamente reportado para cada tejido.

Nuevamente exceptuando al pulmón, en general, la capacidad de respuesta antioxidante ante la radiación corresponde con el grado de radiosensibilidad de cada tejido: los tejidos más sensibles son menos capaces de iniciar una respuesta.

Las respuestas ante la exposición a rayos X se tomaron más tiempo en presentarse en el cerebro y en el hígado. Por su parte, la radiación  $\gamma$  indujo respuestas en tiempos más tempranos.

Las respuestas observadas demuestran que ley de radiosensibilidad se cumple también dentro de diferentes tipos celulares pertenecientes a un mismo tejido y no solamente para tejidos diferentes.

## REFERENCIAS

- Ahsan, K., Lekli, I., Ray, D., Yodoi, J. y Das, D. K. 2009. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: and implication of redox gene therapy in the heart. En: *Antioxidants and redox signaling* 11(11): 2741-2758.
- Albarrán-Ponce, L. Á. 2014. Modulación de la expresión del factor de crecimiento nervioso(NGF) por radiación ionizante en diferentes tejidos de ratón. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 70 pp.
- Alcaraz-Baños, M. 2003. Bases físicas y biológicas del radiodiagnóstico médico. EDITUM. 272 pp.
- Attix, F. H. 1986. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. John Wiley & Sons. 628 pp.
- Avti, P. K., Pathak, C. M., Kumar, S., Kaushik, G., Kaushik, T., Farooque, A., Khanduja, K. L. y Sharma, S. C. 2005. Low dose gamma-irradiation differentially modulates antioxidant defense in liver and lungs of Balb/c mice. En: *International Journal of Radiation Biology* 81(21): 901-910.
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P. y Pain, D. 2012. Ionizing radiation induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. En: *Cancer Letters* 327(1-2): 48-60.
- Baxter, P. S y Hardingham, G. E. 2016. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. En: *Free Radical Biology and Medicine* 100: 147-152.
- Bergonié, J. y Tribondeau, L. 2003. Interpretation of Some Results from Radiotherapy and an Attempt to Determine a Rational Treatment Technique. En: *Yale Journal of Biology and Medicine* 76: 181-182
- Braunstein, S., Badura, M. L., Xi, Q., Formenti, S. C. y Schneider, R. J. 2009. Regulation of protein synthesis by ionizing radiation. En: *Molecular and Cellular Biology* 29(21): 5645-5656.
- Burchfield, L. A. 2009. Radiation Safety. Protection and Management for Homeland Security and Emergency Response. John Wiley and Sons. 312 pp.
- Bushong, S. C. 2013. Manual de radiología para técnicos: Física, biología y protección radiológica. Elsevier España. 664 pp.
- Candelario-Jalil, E., Mhadu, N. H., Al-Dalain, S. M., Martínez, G. y León, O. S. 2001. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient ischemia in gerbils. En: *Neuroscience Research* 41(3): 233-241.

- Cardozo-Pelaez, F., Sonj, S., Parthasarathy, A., Hazzi, C., Naidu, K. y Sanchez-Ramos, J. 1999. Oxidative DNA damage in the aging mouse brain. En: *Movement Disorders* 14(6): 972-980.
- Cardozo-Pelaez, Brooks, P. J., Stedford, T., Song, S. y Sánchez-Ramos, J. 2000. DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. En: *Free Radical Biology & Medicine* 28(5): 779-785.
- Chandra, J., Samali, A. y Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. En: *Free Radical Biology and Medicine* 29: 323-333.
- Colangelo, A. M., Pani, L. y Mocchetti, I. 1996. Correlation between increased AP-1<sub>NGF</sub> binding activity and induction of nerve growth factor transcription by multiple signal transduction pathways in C6-2B glioma cells. En: *Molecular Brain Research* 35: 1-10.
- Coss-Rojas, A. C. 2014. Hormesis, una revolución en biología y toxicología. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 65 pp.
- Criswell, T., Leskov, K., Miyamoto, S., Guangbin, L. y Boothman, D. A. 2003. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. En: *Oncogene* 22: 5813-5827.
- Cuadrado, A., Martín-Moldes, Z., Ye, J. Yy Becker, I. L. 2014. Transcription factors Nrf2 and NF- $\kappa$ B are coordinated effectors of the Rho Family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. EN: *The Journal of Biological Chemistry* 289(22): 15244-15258.
- Davies, A. M. 1994. The role of neurotrophins in the developing nervous system. En: *Journal of Neurobiology* 25(11): 1334-1338.
- Elejalde-Guerra, J. J. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. En: *Anales de Medicina Interna* 18(6): 326-335.
- Fajardo-Miranda, R. M. 2013. Modulación de la respuesta antioxidante debido a radiación ionizante en un modelo murino. Tesis Profesional. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 88 pp.
- Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B. Y Coughlin, M. D. 2001. The precursor pro-Nerve Growth Factor is the predominant form of Nerve Growth Factor in Brain and is increased in Alzheimer's Disease. En: *Molecular and Cellular Neuroscience* 18: 210-220
- Friedman, W. J. y Greene, L. A. 1999. Neurotrophin signaling via Trks and p75. En: *Experimental Cell Research* 253: 131-142.

- Hall, E. J. y Giaccia, A. J. 2012. Radiobiology for the radiologist. Lippincott Williams & Wilkins. 576 pp.
- Halliwell, B. 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. En: *Nutrition Reviews* 52(8): 253- 265.
- Halliwell, B. 2001. Free radicals and other reactive species in disease. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/npg.els.0002269
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. En: *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Halliwell, B. 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? En: *Trends in Pharmacological Sciences* 32 (3): 125-130.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. 851 pp.
- Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Rüther, U., Wagner E. F y Thoenen, H. 1990. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by *c-fos*. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 3899-3903.
- Huang, E. J. y Reichardt, L. F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. En: *Annual Review of Neuroscience* 24: 677-736.
- Hussain, S., Slikker, J. R. y Ali, S. F. 1995. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. En: *International Journal of Developmental Neuroscience* 13(8): 811-817.
- Jackson, G. R., Apffel, L., Werrbach-Pérez, K y Pérez-Polo, J. R. 1990. Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. I. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. En: *Journal of Neuroscience Research* 25(3): 360-368.
- Jehan, F., Neveu, I., Naveilhna, P., Brachet, P. y Wion, D. 1993. Complex interactions among second messenger pathways, steroid hormones, and proto-oncogenes of the Fos and Jun families converge in the regulation of the nerve growth factor gene. En: *Journal of Neurochemistry* 60(5): 1843-1853.
- Kansanen, E., Kousmanen, M., Leinonen, H., Levonen, A-L. 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanism of activation and dysregulation in cancer. En: *Redox Biology* 1: 45-49.



- Kobayashi, M. y Yamamoto, M. 2006. Nrf2-Keap1 regulation of celular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. En: *Advances in Enzymes Regulation* 46:113-140.
- Kodavanti, P. R., Royland, J. E., Richards, J. E., Besas, J. y MacPhail, R. C. 2011. Toluene effects on oxidative stress in brain regions of young-adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. En: *Toxicology and Applied Pharmacology* 256(3): 386-398.
- Kohen, R. y Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. En: *Toxicologic Pathology* 30(6): 620- 650.
- Kojima, S., Matsuki, O., Nomura, T., Kubodera, A., Honda, Y., Honda, S., Tanooka, H., Wakasugi, H. y Yamaoka, K. 1998a. En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1381: 312-318.
- Kojima, S., Matsuki, O., Nomura, T., Shimura, N., Kubodera, A., Yamaoka, K., Tanooka, H., Wakasugi, H, Honda, Y., Honda, S. y Sasaki, T. 1998b. En: *Brain Research* 808: 262-269.
- Köningberg-Fainstein, M. 2007. Nrf2: la historia de un Nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. En: *Revista de Educación Bioquímica* 26(1): 18-25.
- Kosaka, K., Mimura, J., Itoh, K., Satoh, T., Shimojo, Y., Kitajama, C., Maruyama, A., Yamamoto, M. y Shirasawa, T. 2009. Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells. En: *The Journal of Biochemistry* 147(1): 73-81.
- Krock, E., Currie, B., Weber, M. H., Ouellet, J. A., Stone, L. S., Rosenzweig, D. H. y Haglund, L. 2016. Nerve growth factor is regulated by Toll-like receptor 2 in human intervertebral discs. En: *The Journal of Biological Chemistry* 291(7): 3541-3551.
- Kudryashov, Y. B. 2008. Radiation Biophysics (Ionizing Radiations). Nova Publishers. 327 pp.
- Lee, W-J., Majumder, Z. O., Jeoung, D-I., Lee, H-J., Kim, S-H., Bae, S. y Lee, Y-S. 2006. Organ-specific gene expressions in C57BL/6 mice after exposure to low-dose radiation. En: *Radiation Research* 165: 562-569.
- Levi-Montalcini, R. 1987. The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. En: *The EMBO Journal* 6(5): 1145-1154.
- Lewin, G. R. y Barde, Y. A. 1996. Physiology of neurotrophins. En: *Annual Review of Neuroscience* 19: 289-317.
- Li, Y., Paonessa, P. D. y Zhang, Y. 2012. Mechanism of chemical activation of Nrf2. En: *Plos One* 7(4).  
Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035122>

- Lodish, H., Berk, A., Matsudira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky y Darnell, J. 2008. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman. 1150 pp.
- Lommatzsch, M., Quarcoo, D., Schulte-Herbrüggen, O., Weber, H., Virchow, J. C., Renz, H. y Braun, A. 2005. Neurotrophins in murine viscera: a dynamic pattern from birth to adulthood. En: *International Journal of Developmental Neuroscience* 23: 495-500.
- Lu, B., Pang, P. T. y Woo, N. H. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. En: *Nature Reviews. Neuroscience* 6: 603-614.
- Ma, Q. 2013. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. En: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53: 401-426.
- Maksimović, I. D., Jovanović, M. D., Colić, M., Mihajlović, R., Mičić, D., Selaković, V., Ninković, M., Malicević, Z., Rusić-Stojiljković, M. y Jovčić, A. 2001. Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. En: *Vojnosanitetski pregled* 58(3): 237-242.
- McDonald, J. T., Kim, K., Norris, A., Vlashi, E., Phillips, T. M., Lagadec, C., Donna, L. D., Ratikan, J., Szlag, H., Hlatky, L. y McBride, W. H. 2010. Ionizing Radiation activates the Nrf2 antioxidant response. En: *Cancer Research* 70(21): 8886-8895.
- Mimura, J., Kosaka, K., Maruyama, A., Satoh, T., Harada, N., Yoshida, H., Satoh, K., Yamamoto, M. e Itoh, K. 2011. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. En: *The Journal of Biochemistry* 150(2): 209-217.
- Mitra, S., Siddiqui, W. A. y Khandelwal, S. 2014. Early cellular responses against tributyltin chloride exposure in primary cultures derived from various brain regions. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37(8): 1049-1059.
- Mohamed, M. I., Mohammad, M. K. A., Zakaria, A. M., Ghazali, N., Razak, H. R. A. y Saad, W. M. M. 2014. Induction of oxidative stress following low dose ionizing radiation in ICR mice. En: *World Journal of Medical Sciences* 10(2): 198-203.
- Montes, S., Juárez-Rebollar, D., Nava-Ruíz, C., Sánchez-García, A., Heras-Romero, Y., Ríos, C. y Méndez-Armenta, M. 2015. Immunohistochemical study of Nrf2-antioxidant response element as indicator of oxidative damage induced by cadmium in developing rats. En: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/570650>
- Morgan, W. F. 2003. Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation- Induced Genomic Instability and Bystander Effects *In Vitro*. En: *Radiation*

*Research 159*: 567- 580.

Nagai, R., Tsunoda, S., Hori, Y. y Asada, H. 2000. Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. En: *Surgical Neurology* 53(5): 503-506.

NCRP. 2009. NCRP Report No. 160. Ionizing radiation exposure of the population of the United States.

Nguyen, T., Nioi, P. y Pickett, C. B. 2009. The Nrf2-antioxidan response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. En: *The Journal of Biological Chemistry* 284(20): 13291-13295.

Nickoloff, E. L. y Anderson, P. O. 2001. En: *American Journal of Roentology* 177: 285-287.

Ninković, M. B., Jovanović, M. D., Malicević, Z., Dukić, M., Jelenović, A. Mihajlović, R., Vasiljević, I y Jovicić A. 2000. Effects of nerve growth factor on antioxidative system in the thalamus of MPTP treated Wistar rats. En: *Vojnosanitetski pregled*. 57(3): 257-63.

Nistico, G., Ciriolo, M. R., Fiskin, K., Iannone, M., de Martino, A. y Rotilio, G. 1992. NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. En: *Free Radical Biology & Medicine* 12: 177-181.

Nomura, T., Kinuta, M., Hongyo, T., Nakajima, H. y Hatanaka, T. 1992. Programmed cell death in whole body and organ systems by low dose irradiation. En: *Journal of Radiation Research* 33 Suppl: 109-123.

Pan, Z. y Pérez-Polo, R. 1993. Role of Nerve Growth Factor in Oxidant Homeostasis: Glutathione Metabolism. En: *Journal of Neurochemistry* 61(5): 1713-1721.

Pang, X., Panee, J., Liu, X., Berry, M. J., Chang, S. L., Chang, L. 2013. Regional variations of antioxidant capacity and oxidative stress responses in HIV-1 transgenic rats with and without methamphetamine administration. En: *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 8(3): 691-704.

Platzman, R. 1958. The physical and chemical basis of mechanisms in radiation biology. Pp.: 15-72 En: *Radiation Biology and Medicine. Selected Reviews in the Life Sciences*. Adison-Wesley.

Ratikan, J. A, Micewicz, E. A., Xie, M. W. y Schae, D. 2015. Radiation takes its toll. En: *Cancer Letters* 368: 238-245.

Riley, P. A. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. En:

*International Journal of Radiation Biology* 65(1): 27-33.

Reichardt, L. F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. En: *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361: 1545-1564

Rushworth, S. A., Zaitseva, L., Murray, M. Y., Shah, N. M., Bowles, K. M. y MacEwan, D. J. 2012. The high expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF- $\kappa$ B and underlies its chemo-resistance. En: *Blood* 120(26): 5188-5198.

Sachdeva, S., Pant, S. C., Kushwaha, P., Bhargava, R. y Flora, S. J. 2015. Sodium tungstate induced neurological alterations in rat brain regions and their response to antioxidants. En: *Food and Chemical Toxicology* 82: 64-71.

Salas-López, I. E. 2016. Inducción de proteínas con efecto antioxidante (Trx, NGF y Nrf2) en ratones machos balb/c expuestos a rayos X. Tesis profesional. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 175 pp.

Salazar, M., Rojo, A. I., Velasco, D., de Sagarra, R. M. y Cuadrado, A. 2006. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibits the xenobiotic and antioxidant cells response by direct phosphorylation and nuclear exclusión of the transcription factor Nrf2. En: *The Journal of Biological Chemistry* 281(21): 14841-14851.

Salinas, M., Díaz, R., Abraham, N. G., Ruiz de la Garreta, C. M. y Cuadrado, A., 2003. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. En: *The Journal of Biological Chemistry* 278(16): 13898-13904.

Sampath, D. Jackson, G. R., Werrbach-Perez, K. y Perez-Polo, J. R. 1994. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 Cells. En: *Journal of Neurochemistry* 62(6): 2476-2479.

Sekhar, K. R. y Freeman, M. L. 2015. Nrf2 promotes survival following exposure to ionizing radiation. En: *Free Radical Biology and Medicine* 88: 268-274.

Shelly, C. L. 2009. Regulation of glutathione synthesis. En: *Molecular Aspects of Medicine* 30(1-2) 42-59.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. En: *Experimental Physiology* 82: 291-295.

- Siqueira, I. R., Fochesatto, C., de Andrade, A., Santos, M., Bello-Klein, A. y Netto, C. A. 2005. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. En: *International Journal of Developmental Neuroscience* 23(8): 663-671.
- Singh, B., Chatterjee, A., Rongghe, A. M., Bhat, N. K. y Bhat, H. K. 2013. Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via Nrf2 induction is associated with the inhibition of oxidative damage in estrogen-induced breast cancer. En: *BMC Cancer* 13:253.
- Sofroniew, M. V., Howe, C. L. y Mobley, W. C. 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. En: *Annual Review of Neuroscience* 24: 1217-1281.
- Suciu, D. 1983. Cellular Death by Apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues. En: *Journal of theoretical Biology* 105: 391-401.
- Sun, Z., Hu, W., Yin, S., Lu, X., Zuo, W., Ge, S. y Xu, Y. 2017. NGF protects against oxygen and glucose deprivation-induced oxidative stress and apoptosis by up-regulation of HO-1 through MEK/ERK pathway. En: *Neuroscience Letters* 641: 8-14.
- Tanaka, N., Ikeda, Y., Ohta, Y., Deguchi, K., Tian, F., Shang, J., Matsuura, T y Abe, K. 2011. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. En: *Brain Research* 1370: 246-253.
- Turpaev, K. T. 2013. Keap1-Nrf2 signaling pathway: Mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. En: *Biochemistry (Moscow)* 78(2): 111-126.
- UNSCEAR. 2008. Exposures of the public and workers from various sources of radiation (Annex B). En: *Sources and effects of ionizing radiation. Volume I*. United Nations Publication. 243 pp.
- Vázquez-Vázquez, M. A. 2011. Modulación de proteínas antioxidantes por radiación ionizante en distintos órganos de ratón. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F. 89 pp.
- Valdovinos-Flores, C. y Gonsebatt, M. E. 2013. Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic and acetaminophen. En: *Free Radical Research* 47(5): 404-412.
- Vogin, G. y Foray, N. 2013 The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. En: *International Journal of Radiation Biology* 89(1): 2-8.

- Wang, X. y Michaelis, E. K. 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. En: *Frontiers in Aging Neuroscience* 2. Doi: 10.3389/fnagi.2010.00012.
- Wardyn, J. D., Ponsford, A. H. y Sanderson, C. M. 2015. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. En: *Biochemical Society Transactions* 43: 621-626.
- Wiesmann, C. y de Vos A. M. 2001. Nerve growth factor: structure and function. En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 748-759.
- Xia, B., Liu, H., Xie, J., Wu, R. y Li, Y. 2015. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth via activating the Nrf2/ARE pathway. En: *International Journal of Molecular Medicine* 36: 1426-1432.
- Yadav, A. y Mishra. P. C. 2013. Modeling the activity of glutathione as a hydroxyl radical scavenger considering its neutral non-zwitterionic form. En: *Journal of Molecular Modeling* 19(2): 767-777.
- Yamamoto, M., Sobue, G., Yamamoto, K., Terao, S. y Mitsuma, T. 1996. Expression of mRNAs for Neurotrophic Factors (NGF, BDNF, NT-3 and GDNF) and Their Receptors (p75<sup>NGFR</sup>, TrkA, TrkB and TrkC) in the Adult Human Peripheral Nervous System and Nonneural Tissues. En: *Neurochemical Research* 21(8): 929-938.
- Yamaoka, K., Edamatsu, R. y Mori, A. 1991. Increased SOD activities and decreased lipid peroxide levels induced by low dose X irradiation in rat organs. En: *Free Radical Biology & Medicine* 11: 299-306.
- Yan, W., Wang, H-D., Feng, X-M., Ding, Y-S., Jin, W. y Tang, K. 2009. The expression of NF-E2-Related Factor 2 in the rat brain after traumatic brain injury. En: *The Journal of Trauma* 66(5): 1431-1435.
- Yoo, J-M., Lee, B. D., Sok, D-E., Ma, J. Y. y Kim M. R. 2017. Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/Antioxidant enzyme in neuronal cells. En: *Redox Biology* 11: 592-599.