



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADOS
POR LA VÍA NRF2/KEAP1/ARE EN UN MODELO DE EXCITOTOXICIDAD
EXPUESTO AL AGENTE ANTIOXIDANTE S-ALILCISTEÍNA EN REBANADAS
CORTICALES DE RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓLOGA. REYES SOTO CAROLINA YOLOTZIN

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. ANAHÍ CHAVARRIA KRAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., JUNIO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADOS
POR LA VÍA NRF2/KEAP1/ARE EN UN MODELO DE EXCITOTOXICIDAD
EXPUESTO AL AGENTE ANTIOXIDANTE S-ALILCISTEÍNA EN REBANADAS
CORTICALES DE RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓLOGA. REYES SOTO CAROLINA YOLOTZIN

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANAHÍ CHAVARRIA KRAUSER

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2021



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/513/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de marzo de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **REYES SOTO CAROLINA YOLOTZIN** con número de cuenta 308289853 con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADOS POR LA VÍA NRF2/KEAP1/ARE EN UN MODELO DE EXCITOTOXICIDAD EXPUESTO AL AGENTE ANTIOXIDANTE S-ALILCISTEÍNA EN REBANADAS CORTICALES DE RATA**", realizada bajo la dirección del **DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Vocal: DRA. SONIA GALVÁN ARZATE
Vocal: DRA. ANA LAURA COLÍN GONZÁLEZ
Secretario: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 31 de mayo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos Institucionales

Mi gratitud va dirigida a las instituciones que facilitaron el desarrollo de la investigación. Agradezco, en primer lugar, al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB-UNAM), el cual me brindó la oportunidad de desarrollarme tanto académica como culturalmente, permitiéndome conocer y vivir todo lo que rodea a esta gran institución.

A continuación, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) le agradezco la beca recibida durante la maestría (clave becaria 959177).

También quiero expresar mi agradecimiento a las personas que apoyaron este proyecto. En primer lugar, al Dr Abel del Ángel Santamaría, quien me acompañó y creyó en esta investigación. Sus rigurosas y agudas críticas, así como sus atentas y pacientes observaciones, fueron centrales para analizar y concluir los experimentos y los desafíos abordados.

Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Anahí Chavarria Krauser, quien, me abrió las puertas de su laboratorio y permitió que realizara parte de los experimentos en él, por su apoyo y orientación que estimuló mi desarrollo personal y profesional.

Le agradezco al Dr José Pedraza Chaverrí por sus atinados comentarios y observaciones, así como por siempre estar dispuesto a recibirme y orientarme respecto a las inquietudes que surgieron durante el desarrollo de esta investigación.

Agradecimientos a título personal

Le doy gracias a mis papás, por haberme apoyado en todo momento, por los valores que me han inculcado, por darme la oportunidad de tener una excelente educación y por alentarme a seguir preparándome en el transcurso de mi vida. Les agradezco por haber forjado la persona que soy hoy en día, ustedes me formaron con reglas, pero al mismo tiempo con ciertas libertades y siempre me motivaron para que pudiera alcanzar mis sueños. Me enseñaron a enfrentar las adversidades y no rendirme, aunque el camino no fuera fácil, gracias por todo su tiempo, enseñanzas, esfuerzo, apoyo, dedicación y amor incondicional. Gracias mami por estar para mí, por siempre acompañarme en todo momento, por escucharme incontables veces y por ser mi apoyo constante, me has enseñado que el formar una familia implica un acto de generosidad, gracias por tanto. Gracias papá por acompañarme a lo largo de mi trayectoria escolar y profesional. Este trabajo no es solo mío también les pertenece a ustedes, los amo.

A mi hija por llenar mi vida de alegrías, dichas y amor cuando más lo he necesitado, te agradezco infinitamente por entender que, mediante el proceso de elaboración de esta tesis, fue necesario realizar sacrificios, como ceder momentos a tu lado. Eres mi mayor tesoro y también la fuente más pura de mi inspiración, gracias por recibirme con un abrazo reconfortante y una cálida sonrisa en los días más difíciles y por alentarme a no darme por vencida, eres y serás siempre mi motor, mi vida es hermosa porque existe tú, te amo Esme.

También quiero agradecerles a mi abuelita y a mi tía Lucy porque gracias a su esfuerzo y sacrificio pude tener la oportunidad de prepararme, ustedes son un claro ejemplo de entrega y amor a la familia.

A mi bisabuelita Santa que, aunque ya no se encuentre con nosotros físicamente, siempre estará presente en mi corazón, gracias por haber creído en mí y apoyarme hasta el último momento.

A mis primos, primas y mis tías, por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar, siempre me escucharon cuando les platicaba de cómo iba avanzando en mi proyecto, gracias por esas tardes de charlas interminables y por estar siempre para mí en los buenos y malos momentos. En particular quiero

agradecerte a ti Nico, eres un ejemplo claro de superación personal, gracias por recordarme que, aunque el camino sea adverso, la determinación y el amor hacia los nuestros y la vida misma, nos hacen superar las batallas más grandes.

A mis amigos por confiar, creer en mí y por haber hecho de mi etapa de posgrado un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

Varios investigadores contribuyeron con observaciones, consejos o críticas a este proyecto. Entre ellos quiero agradecer, especialmente, a la Dra. Sonia Galván, por el tiempo y paciencia dedicados, su compañía, calidez humana y orientación fueron claves para la conclusión en tiempo y forma de este trabajo.

También quiero expresar mi gratitud al Dr. Alejandro Silva por la ayuda desinteresada que me ofreció y el tiempo dedicado para ayudarme a desarrollar parte de los experimentos en su laboratorio, su cordialidad y amabilidad es algo que siempre recordare. Al Dr. Edgar Rangel por haberme apoyado y explicado protocolos que eran nuevos para mí, estoy infinitamente agradecida por su dedicación y las observaciones o sugerencias que me hacía en los seminarios, los cuales fueron de mucha utilidad para mi desarrollo profesional. Y por último, pero no menos importante a la Dra. Ana Colin, por brindarme espacio, comentarios y alicientes indispensables para la terminación de esta obra.

Otros colegas contribuyeron sobre puntos tangenciales de este proyecto; entre ellos quiero reconocer el trabajo de Sol y Aline, sus enseñanzas fueron pilares fundamentales para el desarrollo y conclusión del mismo.

Dedicatoria

Este trabajo quiero dedicárselo especialmente a mis papás, porque creyeron en mí y me formaron dándome ejemplos dignos de superación, cariño y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de la maestría. Su amor y enseñanzas me permitieron concluir esta etapa profesional, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Esta tesis también se la dedico mi hija Esmeralda, tu afecto y tu cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. A tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñando muchas cosas de esta vida. Te agradezco por ayudarme a darme encontrar el lado dulce a la vida, fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de tesis. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, cariño, comprensión y sus consejos en los momentos difíciles. Gracias familia por darme siempre alas para volar, raíces para volver y razones para quedarme.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS..... | 5 |
| 1.2 EXCITOTOXICIDAD..... | 6 |
| 1.3 RECEPTORES DE GLUTAMATO..... | 7 |
| 1.3.1 RECEPTORES METABOTRÓPICOS E IONOTRÓPICOS..... | 7 |
| 1.3.2 RECEPTORES NMDA..... | 8 |
| 1.4 ESTRÉS OXIDANTE..... | 11 |
| 1.4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO..... | 12 |
| 1.4.2 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO..... | 15 |
| 1.5 SISTEMAS ANTIOXIDANTES..... | 16 |
| 1.5.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS..... | 17 |
| 1.5.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS..... | 18 |
| 1.6 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2..... | 19 |
| 1.6.1 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2 Y LA VÍA KEAP1/NRF2/ARE..... | 20 |
| 1.7 LA VÍA DE LA KINURENINA (VK)..... | 23 |
| 1.7.1 ÁCIDO QUINOLÍNICO Y MECANISMO DE EXCITOTOXICIDAD..... | 25 |
| 1.8 MICROGLÍA Y SU PAPEL EN LA MODULACIÓN DE GLUTAMATO Y CITOCINAS INFLAMATORIAS..... | 27 |
| 1.9 S-ALILCISTEÍNA..... | 29 |
| 1.9.1 EFECTO BIOLÓGICO DE SAC..... | 30 |
| 1.10 VÍAS METABÓLICAS DE SEÑALIZACIÓN..... | 32 |
| 1.10.1. VÍA DE ERK..... | 32 |
| 1.11FACTORES NEUROTÓFICOS..... | 33 |
| 1.11.1NEUROTROFINAS..... | 33 |
| 1.11.2 FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF)..... | 34 |
| 1.12 RECEPTORES TRK..... | 35 |
| 1.13 EXCITOXICIDAD Y BDNF..... | 36 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 38 |
| 3. HIPÓTESIS | 38 |
| 4. OBJETIVOS | 38 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 38 |
| 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 38 |
| 5. METODOLOGÍA | 40 |
| 5.1 ANIMALES..... | 40 |
| 5.2 OBTENCIÓN DE REBANADAS CORTICALES DE CEREBRO DE RATA..... | 40 |
| 5.3 TRATAMIENTOS DE REBANADAS CORTICALES..... | 40 |
| 5.4 ENSAYO DE ACTIVIDAD REDUCTORA CELULAR (MTT)..... | 41 |
| 5.5 ENSAYO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA..... | 42 |
| 5.6 ENSAYO DE GSH/GSSG..... | 42 |
| 5.7 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR IP..... | 43 |
| 5.8 AISLAMIENTO DE FRACCIONES CITOSÓLICAS Y NUCLEARES..... | 45 |
| 5.9 ENSAYO DE UNIÓN A NRF2 / ARE..... | 45 |
| 5.10 ANÁLISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA..... | 46 |
| 5.11 TNF α Y BDNF ELISA TITULACIÓN..... | 46 |
| 5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 47 |
| 6. RESULTADOS | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1 LA ADMINISTRACIÓN DE SAC PRESERVA LA ACTIVIDAD REDUCTORA ALTERADA POR EL QUIN EN REBANADAS CORTICALES..... | 48 |
| 6.2 SAC PREVIENE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA INDUCIDA POR QUIN EN REBANADAS CORTICALES..... | 49 |
| 6.3. LA SAC MEJORÓ LOS NIVELES DE GLUTATIÓN MODIFICADOS POR EL QUIN..... | 50 |
| 6.4. EL TRATAMIENTO CON SAC REDUJO EL DAÑO CELULAR INDUCIDO POR QUIN | 52 |
| 6.5. LA SAC RECUPERÓ LA ACTIVIDAD DE UNIÓN A NRF2 / ARE CUYA DISMINUCIÓN FUE INDUCIDA POR QUIN..... | 55 |
| 6.6. LA SAC PREVINO LA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA HO-1 INDUCIDO POR QUIN..... | 56 |
| 6.7. LA DISMINUCIÓN EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 INDUCIDA POR QUIN FUE PARCIALMENTE EVITADA POR SAC | 57 |
| 6.8 LA SAC DISMINUYÓ LA DISMINUCIÓN DE BDNF INDUCIDO POR QUIN..... | 58 |
| 6.9 LA SAC PREVINO EL AUMENTO INDUCIDO POR EL QUIN EN LOS NIVELES DE TNF- α | 59 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 60 |
| 8. CONCLUSIÓN..... | 65 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|--|
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropiónico |
| ARE | Elemento de respuesta antioxidante |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| BHE | Barrera hematoencefálica |
| CAT | Catalasa |
| CTE | Cadena de transporte de electrones |
| EAAT | Transportador de aminoácidos excitadores |
| EO | Estrés oxidante |
| ERK 1/2 | Cinasa regulada por señal extracelular 1/2 |
| ERN | Especies reactivas de nitrógeno |
| ERO | Especies Reactivas de oxígeno |
| FNs | Factores Neurotróficos |
| γ GCL | Gamma glutamato cisteína ligasa |
| GLU | Glutamato |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación disulfuro |
| GST | Glutación S-transferasa |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HO-1 | Hemo oxigenasa-1 |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| IL | Interleucinas |
| Keap 1 | Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch |
| KYN | Ácido kinurénico |
| MAPK | Proteína cinasas activadas por mitógenos |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotido |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido |

| | |
|------------------------------|--|
| NQO-1 | Quinona oxidorreductasa - 1 |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NMDAr | Receptores N-metil-D-aspartato |
| NTs | Neurotrofinas |
| •NO | Óxido nítrico |
| NOS | Sintasa de óxido nítrico |
| Nrf2 | Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 |
| O ₂ ^{•-} | Anión superóxido |
| •OH | Radical hidroxilo |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| QUIN | Ácido quinolínico |
| SAC | S-alilcisteína |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| Tk | Tirosina cinasa |
| TrkB | Receptor de tropomiosina cinasa B |
| Trp | Triptófano |
| VK | Vía de la kinurenina |

Resumen

Varios procesos están involucrados en la degeneración del Sistema Nervioso Central (SNC), incluidas las alteraciones moleculares como el plegamiento y agregación de proteínas, la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el estrés oxidante (EO) y alteraciones bioenergéticas. La potencia oxidativa de ERO se caracteriza por varias alteraciones metabólicas, incluidas la alteración de las membranas lipídicas que comprometen la integridad celular, la disfunción mitocondrial y la disminución de los niveles de ATP. A su vez, la disminución de ATP provoca la despolarización de las membranas celulares y el influjo masivo de iones Ca^{2+} a través de canales activados por voltaje (excitotoxicidad), lo que activa la formación de óxido nítrico (NO) por la activación de la NO sintasa (NOS) y conduce a la pérdida de la función neuronal por EO y muerte celular (Olanow, 1993).

El ácido quinolínico (QUIN) es una molécula endógena producida por el catabolismo del triptófano (Trp) mediante la vía de la kinurenina (VK) (Pérez-De la Cruz et al, 2012; Schwarcz et al, 2012). La relevancia de esta vía radica en que la evidencia sugiere que más del 90% del Trp es metabolizado a través de esta ruta en el SNC de los mamíferos, y es responsable de la formación de metabolitos intermedios con propiedades neuroactivas, como el ácido kinurénico (KYNA) y el QUIN (Schwarcz et al, 2012). El QUIN constituye una herramienta experimental útil para explorar eventos excitotóxicos, ya que en altas concentraciones, actúa como un agonista en los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAr), lo que lleva a un aumento intracelular de Ca^{2+} , un metabolismo alterado y genera muerte neuronal (Stone et al, 2003). También, se ha demostrado que el QUIN induce EO y neurodegeneración mediante la formación de ERO (Santamaría et al, 2001), además aumenta la liberación de glutamato (GLU) y disminuye su recaptura (Tavares et al, 2002).

Las ERO tienen un papel importante, a bajas concentraciones, en procesos que regulan el crecimiento y la diferenciación celular; sin embargo, en altas concentraciones, las ERO producen EO (Uttara et al, 2009). El daño oxidativo secundario a los cambios en el estado redox, dado por una mayor generación de ERO y una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante puede prevenirse mediante moléculas antioxidantes, que contrarrestan los efectos nocivos de ERO. Además, los compuestos naturales han demostrado ser eficaces para atenuar la formación de ERO, como la S-

alilcisteína (SAC) (Uttara et al, 2009). La SAC es un componente abundante del extracto de ajo envejecido que se sintetiza a partir del catabolismo de γ -glutamyl-S-alilcisteína (Ide et al, 1996; Ide y Lau, 1997). Se han descrito varias propiedades antioxidantes para la SAC, incluida su capacidad para neutralizar ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN), quelar iones Fe^{2+} y Cu^{2+} y reducir la reacción de Fenton, y sus acciones estimuladoras en la síntesis de antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos mediante la activación del Factor de transcripción relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2). Nrf2, es también reconocido como el "regulador maestro" de la homeostasis redox celular, ya que regula al alza la expresión de genes antioxidantes al formar complejos con el Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) en una respuesta defensiva contra agentes xenobióticos y prooxidantes, que se conoce como respuesta de Fase II, y recluta enzimas como hemo oxigenasa - 1 (HO-1), glutatión S - transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GSH-PX), entre otras (Villeneuve et al, 2010). Se ha demostrado que, aunque el QUIN puede regular al alza el Nrf2 a corto plazo como respuesta compensatoria a su cascada tóxica (Colín-González et al, 2014), esta respuesta apenas evoca adaptaciones neuroprotectoras suficientes ya que la actividad de unión Nrf2 / ARE disminuye con la toxina (Colonnello et al, 2020). También, es conocido que la SAC ejerce al menos parte de sus efectos neuroprotectores a través de la regulación positiva de la vía Nrf2 / ARE (Colín-González et al, 2012; García et al, 2014; Song et al, 2020). Aunque algunos de los efectos protectores específicos de la SAC sobre la neurotoxicidad inducida por el QUIN ya se han demostrado (Pérez-De La Cruz et al, 2008;), hasta la fecha no se ha comprobado un mecanismo convincente para atribuir cómo la SAC mejora el daño celular excitotóxico en el SNC y si dicho efecto está mediado por la regulación de las vías de señalización antioxidantes. Además, la regulación inducida por SAC de otras señales neuroprotectoras, como la formación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), a favor de la preservación del tejido cerebral sometido a agresiones excitotóxicas sigue siendo escasa. De hecho, parte del proceso de activación de Nrf2 puede estar subordinado por la estimulación de la vía BDNF-TrkB. Por lo tanto, para caracterizar aún más, los mecanismos neuroprotectores precisos que ofrece la SAC en el contexto de un paradigma excitotóxico, en este trabajo se investigó si los efectos de mejora de este antioxidante en el patrón tóxico inducido por el QUIN están mediados por la activación temprana de la vía Nrf2 / ARE a través de la modulación de la señalización ERK 1/2, así como los niveles de BDNF en tejido.

Abstract

Several processes are involved in the degeneration of the central nervous system (CNS), including molecular alterations such as protein misfolding and aggregation, reactive oxygen species (ROS) formation and oxidative stress (OS) and bioenergetics alterations. The oxidative potency of ROS is characterized by several metabolic alterations, including disruption of lipid membranes that compromise cell integrity, mitochondrial dysfunction, and decreased adenosine triphosphate (ATP) levels. In turn, reduced ATP results in depolarization of cell membranes and massive calcium (Ca²⁺) influx through voltage-gated channels (excitotoxicity), thus augmenting nitric oxide (NO) formation by NO synthase (NOS) activation, and leading to loss of neuronal function by OS, and cell death (Olanow 1993).

Quinolinic acid (QUIN) is an endogenous molecule produced by the catabolism of tryptophan (Trp) towards the kynurenine pathway (KP) (Pérez-De la Cruz et al. 2012; Schwarcz et al. 2012). The relevance of this pathway lies in the evidence suggesting that more than 90% of Trp is metabolized through this route in the CNS of mammals, which is responsible for the formation of intermediate metabolites with neuroactive properties, such as kynurenic acid (KYNA) and QUIN (Schwarcz et al. 2012). QUIN constitutes a useful experimental tool to generate and explore excitotoxic events, since at high concentrations, acts as an agonist on N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr), leading to increased intracellular [Ca²⁺], disrupted metabolism, and neuronal death (Stone et al. 2003). In addition, QUIN has been shown to induce oxidative damage and neurodegeneration via ROS formation (Santamaría et al. 2001), as well as glutamate release and inhibition of glutamate reuptake by glial cells (Tavares et al. 2002).

Cells have developed strategies to use ROS at low concentrations as cell messengers for regulating growth and differentiation processes; however, at high concentrations, ROS produce OS (Uttara et al. 2009). Oxidative damage secondary to changes in redox status comprised of increased ROS generation and decreased antioxidant defense mechanisms can be prevented by antioxidant molecules, that counteract the noxious effects of ROS. Also, exogenous antioxidants from natural compounds have been shown efficacious in attenuating ROS formation; among prominent examples of them are S-allylcysteine (SAC) (Uttara et al. 2009). SAC is an abundant component of aged garlic extract, which is synthesized from γ -glutamyl-S-allylcysteine catabolism (Ide et al.

1996; Ide and Lau 1997). Several antioxidant properties have been described for SAC, including its capacity to neutralize ROS and reactive nitrogen species (RNS), its ability to chelate Fe²⁺ and Cu²⁺ ions and reduce the Fenton reaction and its stimulatory actions on the synthesis of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, the activation of the cytoprotective nuclear factor erythroid 2 (NFE2)–related factor 2 (Nrf2), and the inhibition of pro-oxidant enzymes such as xanthine oxidase, cyclo-oxygenase, and nicotinamide dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) oxidase (Numagami and Ohnishi 2001; Colín-González et al. 2015). Nrf2, also recognized as the “master regulator” of redox cell homeostasis, upregulates the expression of antioxidant genes by complexing with the antioxidant response element (ARE) in a defensive response against xenobiotics and pro-oxidants, which is known as Phase II response, and recruits enzymes such as heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione S-transferase (GST), and glutathione peroxidase (GSH-PX), among several others (Villeneuve et al. 2010).

It has been shown that although QUIN can upregulate Nrf2 in a short-term manner as a compensatory response to its toxic cascade (Colín-González et al. 2014), this response hardly evokes sufficient neuroprotective adaptations since the Nrf2/ARE binding activity is decreased by the toxin (Colonnello et al. 2020). In addition, SAC is known to exert at least part of its neuroprotective effects via upregulation of the Nrf2/ARE pathway (Colín-González et al. 2012; García et al. 2014; Song et al. 2020). Though some of the specific protective effects of SAC on QUIN-induced neurotoxicity have already demonstrated (Pérez-Severiano et al. 2004; Pérez-De La Cruz et al. 2008; Elinos-Calderón et al. 2010), to date, no cogent mechanism has been ascertained to ascribe how SAC ameliorates excitotoxic cell damage in the CNS, and whether such effect is mediated by the regulation of antioxidant signaling pathways. Furthermore, the SAC-induced regulation of other neuroprotective signals—such as the formation of brain derived neurotrophic factor (BDNF)—in favor of the preservation of brain tissue subjected to excitotoxic insults remains scarce. Indeed, part of the process of Nrf2 activation may be subordinated by BDNF-tropomyosin receptor kinase B (TrkB) pathway stimulation. Therefore, to further characterize the precise neuroprotective mechanisms afforded by SAC in the context of an excitotoxic paradigm, here we investigated whether the ameliorative effects of this antioxidant on the toxic pattern induced by QUIN are mediated by early activation of the Nrf2/ARE pathway via the modulation of ERK1/2 signaling, as well as BDNF tissue levels.

1. Introducción

1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas representan un grupo de padecimientos crónicos que se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva de diferentes regiones del SNC, la cual afecta a la población general y tiene repercusiones sociales y económicas importantes (Corona-Vázquez et al, 2002). Diversos factores genéticos y ambientales participan en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas lo que produce alteraciones de los sistemas cognitivos, sensitivos y motores en diversas regiones del cerebro, lo cual influye en el tipo de padecimiento y a su vez se refleja en las características de la enfermedad. Sin embargo, estas enfermedades tienen en común varios mecanismos de daño, como lo son la generación de radicales libres y la liberación de ERO y ERN, el aumento en la cantidad intracelular de Ca^{2+} , la excitotoxicidad, entre otros. Estos y otros mecanismos promueven la muerte celular y de esta manera provocan la neurodegeneración en el tejido cerebral (Martínez et al, 2003).

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas que se han asociado con el EO se encuentran: la esclerosis lateral amiotrófica, Huntington, Parkinson y Alzheimer (Halliwell, 2001; Christen, 2000; Butterfield, 2002). Así, por ejemplo, en esta última, diversas investigaciones han demostrado que el daño oxidante juega un papel esencial en la pérdida de neuronas y la progresión de la demencia (Christen, 2000). El péptido tóxico β -amiloide, presente en el cerebro de las personas con enfermedad de Alzheimer, se produce por la acción de los radicales libres y es responsable, en parte, de la neurodegeneración observada tanto en la aparición como en el progreso de esta patología (Butterfield, 2002). Por otro lado, en la enfermedad de Parkinson, el aumento de EO se asocia a la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Las células de la microglía pueden producir grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$, y causar la oxidación de la dopamina en 6-hidroxidopamina, la cual a su vez puede sufrir una auto-oxidación para formar quinonas las cuales inducen disfunción mitocondrial y apoptosis neuronal (Halliwell, 2001; Jana et al, 2004).

En la actualidad, el estudio de las enfermedades neurodegenerativas y las alternativas farmacológicas para estos padecimientos es de suma importancia, por

esta razón hoy en día, la farmacología se encuentra en la búsqueda de nuevos principios activos que prevengan o disminuyan los procesos neurodegenerativos, de tal manera que mantiene abiertas dos grandes líneas de investigación. La primera intenta prevenir, retardar o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisores, cuyo objetivo principal es enfocarse en su mantenimiento. La segunda centra sus estudios en los procesos de muerte neuronal y en la búsqueda de fármacos que modulen las rutas moleculares y celulares implicadas en estos procesos (Segura et al, 2003).

1.2. Excitotoxicidad

Uno de los mecanismos fundamentales en la muerte neuronal es el proceso de excitotoxicidad, el cual se refiere a la lesión y muerte de las neuronas derivadas de la exposición prolongada a GLU debido a la afluencia excesiva de Ca^{2+} y a la producción de ERO (figura 1) que conduce a la activación de enzimas que degradan proteínas, membranas y ácidos nucleicos (Olney, 1986; Dong et al, 2009).

El aminoácido GLU es el principal neurotransmisor excitador del SNC, se encuentra en concentraciones elevadas en las terminales nerviosas, así como en bajas concentraciones en el espacio extracelular ($< 1 \mu\text{M}$) (Ottersen y Storm, 1984; Gazulla y Cavero, 2006). Las neuronas glutamatérgicas comprenden aproximadamente el 80 % de la población total de neuronas de la corteza cerebral (Somogyi et al, 1998), participan en varios procesos fisiológicos de importancia tales como el desarrollo de la plasticidad, la memoria y el aprendizaje, así como en diversas patologías, entre ellas; la epilepsia, la isquemia cerebral, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, entre otras (Amara y Fontana, 2002; Shigeri et al, 2004). Las acciones fisiológicas del GLU están mediadas a través de la activación de dos familias de receptores: los receptores metabotrópicos y los receptores ionotrópicos (Luján- Miras, 2005).

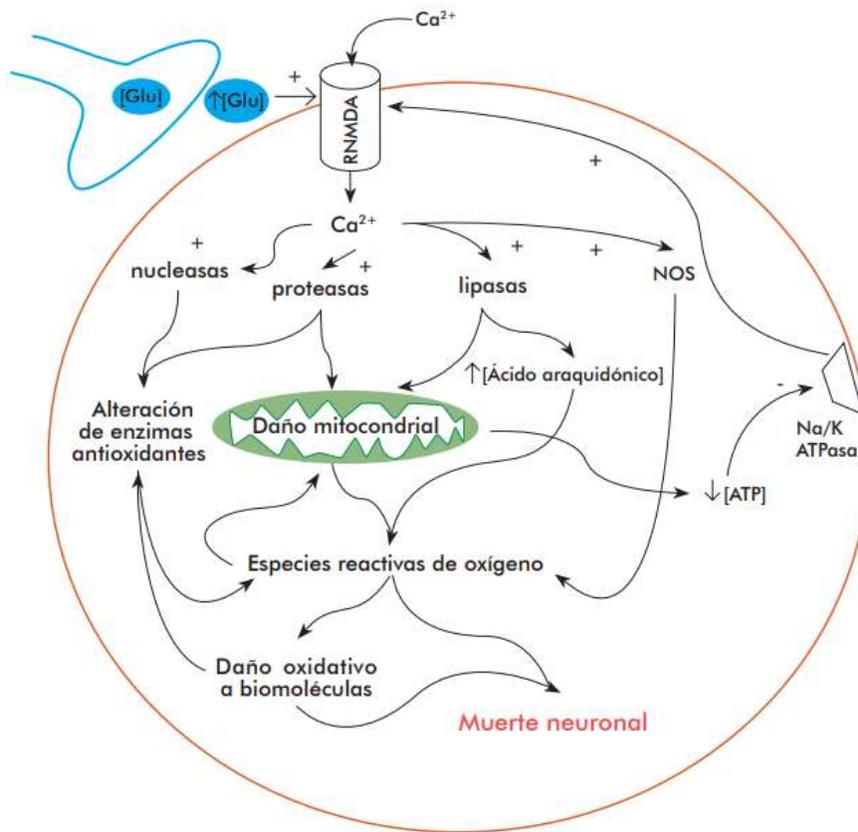


Figura 1 Mecanismo de excitotoxicidad. La activación sostenida del receptor N-metil-D aspartato (NMDAr) por concentraciones incrementadas de glutamato (GLU) provoca la entrada masiva de calcio a la célula lo que activa enzimas líticas y óxido nítrico sintasa (NOS). El daño mitocondrial y el aumento de la concentración de ácido araquidónico es uno de los factores implicados en el incremento de ERO, que conducen a la muerte neuronal provocada por el daño a biomoléculas y la activación de programas de muerte apoptóticos. El déficit energético contribuye a la perpetuación del proceso degenerativo porque favorece la despolarización de la membrana por la pérdida en el funcionamiento de la bomba sodio/potasio (Na/K ATPasa) y mantiene el estado activo del NMDAr. Esto sensibiliza a la célula a la aferencia glutamatérgica normal procedente de la corteza cerebral. (Imagen modificada de Lorigados et al, 2013).

1.3. Receptores de Glutamato

1.3.1. Receptores metabotrópicos e ionotrópicos

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) comprenden una familia heterogénea de receptores que están vinculados a proteínas G, se han clonado y caracterizado ocho receptores metabotrópicos, mGluR1s al mGluR8s, que se dividen en 3 grupos de acuerdo a las vías de señalización que activan. A diferencia de los receptores ionotrópicos la unión de GLU a estos receptores no activa la apertura de un canal de forma intrínseca, sino que regula indirectamente la

transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal a través de la activación o inhibición de las diversas vías de señalización. Por esta razón, la activación de estos receptores es más lenta en el inicio y más duradera en comparación con los ionotrópicos (Simeone et al, 2004).

Los receptores ionotrópicos de GLU se encuentran involucrados en la neurotransmisión rápida en el cerebro, son permeables a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ y se clasifican en tres tipos, en función del agonista que los activa: NMDAr, receptores para ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores de ácido kaínico (Lujan-Míras, 2005). Estos dos últimos receptores también se clasifican como receptores no NMDA (Nakanishi, 1992).

1.3.2. Receptores NMDA

Los NMDAr (Figura 2) se componen de un conjunto de subunidades heterotetraméricas NR1 y NR2, son permeables a la afluencia de Na^+ , Ca^{2+} y el eflujo de K^+ . El sitio de unión a GLU se localiza en la subunidad NR2, mientras que el sitio de unión para la glicina se ubica en NR1. Una característica única del NMDAr es su sensibilidad al voltaje dependiente del Mg^{2+} , que los mantiene bloqueados. Además, el complejo receptor contiene sitios de unión para una variedad de reguladores endógenos, como poliaminas, zinc y protones. Cada subunidad tiene un dominio NH2 terminal-extracelular, cuatro dominios transmembranales (M1 a M4) de los cuales la subunidad M2 contribuye al revestimiento del poro del canal receptor (Nakanishi, 1992).

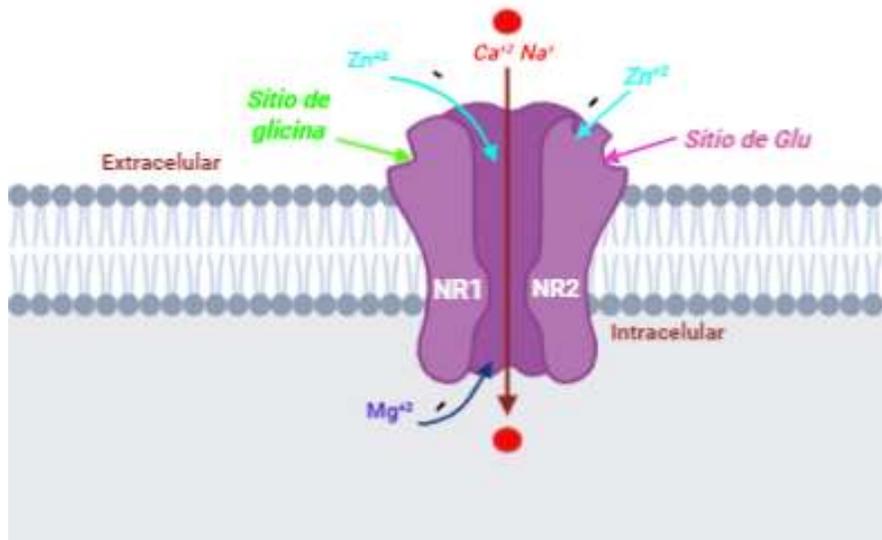


Figura 2. Estructura del rNMDA. Uno de los dímeros del receptor está formado por dos subunidades NR1 y las dos restantes por la combinación homo o heteróloga de las subunidades NR2 (A-D) o NR3 (A-B) (Imagen modificada de Ghasemi y Schachter, 2011).

La activación de los receptores no-NMDA inducen la afluencia de iones Na^+ y salida de K^+ y la posterior despolarización de la membrana plasmática, y la remoción del ion Mg^{2+} que bloqueaba al canal del NMDAr. En el momento que el Mg^{2+} es removido, la unión de GLU-glicina (co-agonista) a sus sitios de unión activa los NMDAr, de esta manera hay una mayor entrada de Na^+ y Ca^{2+} a la célula (Estrada et al., 2008). En otras palabras, la presencia de ambos receptores al mismo tiempo en la misma neurona, tiene una función secuencial, que comienza con una rápida despolarización mediada por los receptores no- NMDA, seguido de una despolarización prolongada consecuente con la activación de NMDAr (Mehdi et al, 2011).

Ya que el GLU activa a sus receptores, este debe ser eliminado del espacio sináptico; por uno de los tres mecanismos de eliminación de neurotransmisores conocidos; difusión, degradación enzimática y recaptura. Este último es el más importante y cumple una doble función: por un lado, termina con la acción sináptica del glutamato y por el otro permite su recuperación para que esta molécula pueda ser eventualmente reutilizada. La recaptura del GLU al interior de las células se lleva a cabo por proteínas específicas llamadas transportadores, las cuales utilizan los

gradientes iónicos de sodio y potasio para moverlo desde el espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y las células gliales (Corona y Tapia, 2005).

El Ca^{2+} tiene diversas funciones neuronales, participa en el crecimiento y diferenciación celular (Yuste y Katz, 1991), procesos de excitotoxicidad (Trifaro y Vitale, 1993), la excitabilidad de la membrana (Marty y Neher, 1985), la exocitosis, la actividad sináptica (Robitaille y Charlton, 1992) y muerte celular (Buchholz et al, 2007). Por lo que su homeostasis es clave para determinar la supervivencia o la degeneración neuronal.

La célula posee diferentes mecanismos para mantener la concentración citoplasmática de Ca^{2+} a nivel submicromolar. La concentración de Ca^{2+} intracelular es regulada por proteínas de unión específica o secuestro a nivel de los organelos de almacenamiento, como el retículo endoplásmico y la mitocondria (Carafoli, 1987). Aunque el retículo endoplásmico presenta una bomba de Ca^{2+} , tiene una baja capacidad de importación de éste, mientras que sucede lo contrario con la mitocondria ya que posee un canal uniporte energizado por el gradiente electroquímico de protones en la membrana interior mitocondrial, el cual tiene una alta capacidad de importación, pero una muy baja afinidad por este catión (Carafoli, 1987). Ambos también poseen mecanismos de salida de Ca^{2+} . La mitocondria excluye al catión gracias a un intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (o en algunos casos $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$), mientras que la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico se logra a través de canales regulados: un canal de rianodina y un canal sensible a fosfatidilinositol-3-fosfato (Berridge, 1984), en el cual se induce la liberación cuando se produce este mensajero por acción de las diferentes fosfolipasas C sobre el fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; esto conlleva a la liberación del diacilglicerol, otro segundo mensajero fundamental, que a su vez estimula la proteína cinasa C, con importantes implicaciones en los mecanismos de señalización celular (Berridge, 1984).

También se ha identificado otra forma de regular o modular los niveles de Ca^{2+} intracelular, la cual está presente en el aparato de Golgi y en vesículas secretoras de insulina en las células β del páncreas. Sin embargo, en estas últimas células su función parece estar más asociada a la secreción de la hormona que a la regulación intracelular del Ca^{2+} (Mitchell et al, 2004).

1.4. Estrés oxidante

El EO se define como el desequilibrio bioquímico que se produce por la formación excesiva de especies reactivas y radicales libres provocando daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por las defensas antioxidantes, lo que genera un daño potencial en el organismo (Halliwell, 1992), que se relaciona con la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, tales como: Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Pérez y Arancibia, 2007).

Los radicales libres son especies químicas, que en su estructura atómica presentan uno o varios electrones desapareados en el orbital externo, proporcionándole una configuración espacial que produce inestabilidad. Se caracterizan por ser muy reactivos y tener una vida media corta, por lo que actúan cerca del sitio en el que se formaron (Venereo, 2002). Como producto del metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, como lo son: las ERO y ERN (Tabla 1). Estas se pueden clasificar en especies radicales y no radicales, su principal fuente de producción son la mitocondria, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y el retículo endoplásmico, aunque también pueden ser generados por diversos factores tales como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones, el tabaco, los medicamentos y algunos xenobióticos como plaguicidas, herbicidas y fungicidas (Maldonado et al, 2010).

Cabe destacar que no todas las especies reactivas son radicales libres, su importancia radica en que pueden difundir y transformarse fácilmente en radicales libres, lo que les da la capacidad de ser dañinas para la célula (Kohen y Nyska, 2002).

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN).

| | ERO | | ERN | |
|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|--------------|
| Radicales | Anión superóxido | $O_2^{\bullet -}$ | | |
| | Hidroxilo | $\bullet OH$ | | |
| | Peroxilo | $\bullet OOR$ | Óxido nítrico | $\bullet NO$ |
| | Perhidroxilo | $\bullet OOH$ | Dióxido de nitrógeno | NO_2 |
| | Alcoxilo | $\bullet OR$ | Nitrato | NO_3 |
| | Dióxido de carbono | CO_2 | | |
| | Oxígeno singulete | 1O_2 | | |
| No Radicales | | | Ácido nitroso | HNO_2 |
| | | | Catión nitrosilo | NO^+ |
| | Peróxido de hidrógeno | H_2O_2 | Anión nitroxilo | NO^- |
| | Ácido hipocloroso | $HOCl$ | Tetróxido de dinitrógeno | N_2O_4 |
| | Ozono | O_3 | Trióxido de nitrógeno | N_2O_3 |
| | Peróxidos orgánicos | $ROOH$ | Peroxinitrito | $ONOO^-$ |
| | | | Peroxinitrato | O_2NOO^- |
| | | Ácido peroxinitroso | $ONOOH$ | |

1.4.1. Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los gases más relevantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, conforma el 47% de la corteza terrestre y el 89 % del peso del agua del mar (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). El oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, pero en altas concentraciones o bajo ciertas condiciones diferentes a las normales, éste puede llegar a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno puede explicarse por la formación de las ERO (Hansberg, 2002).

Las ERO representan la clase más importante de especies oxidantes en los sistemas vivos (Miller et al, 1990), de las cuales hay tres que poseen mayor importancia fisiológica (Miller et al, 1990). Éstas se forman como intermediarios en el proceso de reducción univalente de una molécula de O_2 a H_2O en el metabolismo

celular, estos intermediarios son: radical anión súper oxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$); estas moléculas tienen una gran capacidad de reacción debido a su alta inestabilidad química (Marín-García, 2012). La principal fuente endógena de ERO es la mitocondria debido a la fuga de electrones durante su transporte en la cadena respiratoria (Dasuri et al, 2013). La mitocondria es la fuente principal de generación de $O_2^{\cdot-}$, y se estima que produce alrededor del 85% de este anión en la célula. Esta producción se presenta cuando la mitocondria incrementa la actividad o hay inhibición de la cadena respiratoria, lo que resulta en una producción crónica de este radical, lo cual favorece un estado oxidante en la célula (Maia et al, 2007).

La cadena transportadora de electrones (CTE) consta de cuatro complejos proteicos (I, II, III y IV) que a través de reacciones redox secuenciales transportan electrones de un complejo a otro hasta llegar al O_2 (Szewczyk y Wojtczak, 2002). Durante este transporte puede ocurrir la pérdida del 2-5 % de los electrones que escapan para reaccionar directamente con el O_2 (Boveris y Chance, 1973) y generar ERO. Éstas son producidas principalmente por los complejos mitocondriales I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo bc1) en diferentes rutas celulares (diferenciación celular, apoptosis, envejecimiento, etc.), un aumento en su producción está relacionado con condiciones patológicas. Cuando existe una sobreproducción de estas moléculas contribuyen a la etiopatogenia de diferentes enfermedades (Hamanaka y Chandel, 2010).

Los complejos I y III de la CTE son los principales sitios de producción de $O_2^{\cdot-}$, el exceso en la producción de este radical genera una incapacidad de las mitocondrias para poder producir adenosín trifosfato (ATP) (Andreyen et al, 2005), por lo cual para mitigar dicho incremento, la mitocondria dispone de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) que cataliza la producción de H_2O_2 a partir del $O_2^{\cdot-}$ (que se genera por la respiración mitocondrial y es liberado a la matriz mitocondrial). Si el $O_2^{\cdot-}$ es producido por el complejo III, éste se libera al espacio intermembranal donde es convertido por la superóxido dismutasa dependiente de cobre zinc (Cu/Zn-SOD) en H_2O_2 (Wallace et al, 2010).

Por otro lado, si la concentración de H_2O_2 rebasa los límites estimados, puede reaccionar en presencia de hierro dando lugar a la formación de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) mediante la reacción de Fenton. Así mismo, el H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar entre sí, en presencia de cationes metálicos, mediante la reacción de Haber- Weiss, generando igualmente $\bullet\text{OH}$, una especie altamente reactiva y oxidante (Figura 3). Alternamente el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) para formar peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell, 1992; Peuchen et al, 1997).

La mitocondria y los peroxisomas son considerados como las máximas fuentes productoras de ERO; sin embargo, existen otras fuentes endoteliales que forman estas especies como lo son: 1) la NAD(P)H oxidasa localizada en la membrana plasmática de células de músculo liso vascular y células endoteliales. Esta enzima utiliza NADH o NAD(P)H como donadores de electrones para generar $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Sumimoto et al, 2005); 2) la xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, durante el proceso se genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Hammarström et al, 1999); 3) la sintasa de óxido nítrico (NOS) endotelial es una enzima que cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina produciendo $\bullet\text{NO}$ a partir del átomo terminal del nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina. Esta reacción requiere la presencia de FAD, FMN, NADPH, tetrahidrobiopterina, grupo hemo y calmodulina. En ausencia de cofactores como la tetrahidrobiopterina, la NOS puede desacoplarse y reducir el O_2 para producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ en lugar de transferir electrones a la arginina (Suzuki et al, 2006); 4) el citocromo P450 que oxida ácidos grasos insaturados y xenobióticos y reduce el O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 . Por lo que es importante mantener un equilibrio entre la producción de ERO y los mecanismos de defensa antioxidante, para evitar desencadenar procesos de EO.

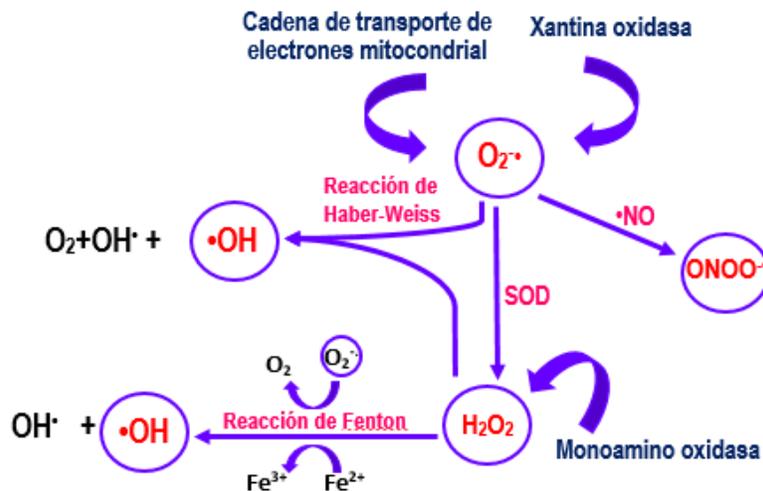


Figura 3. Esquema de generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria ($O_2^{\bullet-}$) anión superóxido, (O_2) oxígeno molecular, ($\bullet NO$) óxido nítrico, ($\bullet OH$) radical hidroxilo, ($ONOO^-$) peroxinitrito, (SOD) superóxido dismutasa, (H_2O_2) peróxido de hidrógeno. (Modificada de Rodríguez, 2009).

1.4.2. Especies reactivas de nitrógeno

Las ERN incluyen especies derivadas del nitrógeno que pueden o no ser radicales libres. Las especies radicales son; óxido nítrico ($\bullet NO$) y dióxido de nitrógeno (NO_2) mientras que las no radicales son; catión nitronio (NO^{2+}) y peroxinitrito ($ONOO^-$), entre otras (Tabla 1). El $\bullet NO$, es importante debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en diversos procesos biológicos. Entre sus funciones se encuentran: 1) regula la presión sanguínea; 2) actúa como mensajero celular al formar parte de los neurotransmisores gaseosos; 3) participa en la vía fagocítica; y 4) regula el proceso apoptótico a través de la modulación de caspasas (Chirino et al., 2006).

El $\bullet NO$ es generado en los tejidos biológicos por la familia de isoenzimas de la NOS, que lo sintetiza a partir de la L-arginina, O_2 y NADPH (Figura 4). Existen tres isoformas de esta enzima: la tipo I o neuronal (nNOS) y la tipo III o endotelial (eNOS) son constitutivas y reguladas por concentraciones intracelulares del complejo Ca^{2+} -calmodulina. La isoforma tipo II o inducible (iNOS) es independiente de Ca^{2+} y es regulada transcripcionalmente por citocinas. En presencia de O_2 , estas isoenzimas

catalizan la conversión de L- arginina a L-citrulina con la formación de $\bullet\text{NO}$ a través de una reacción oxidativa (Valko et al, 2007; Ljubuncic et al, 2010).

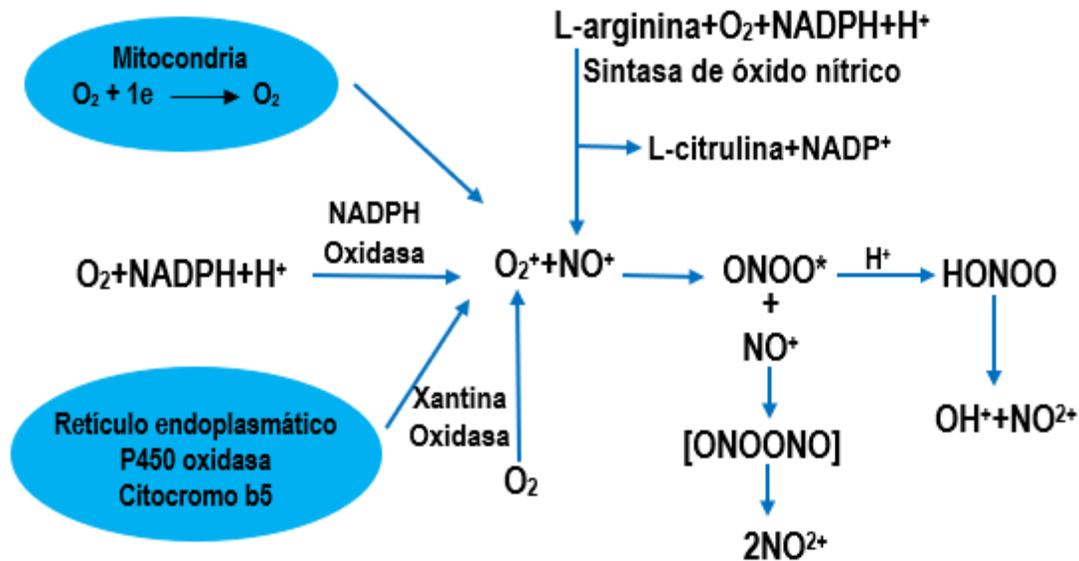


Figura 4. Esquema de generación de Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN). La reacción entre el anión superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) permite la formación de peroxinitrito (ONOO), el cual a su vez es precursor de otras ERN como el ácido peroxinitroso (HONOO) y del radical dióxido de nitrógeno (NO_2). El O_2^- se forma de la reducción del oxígeno molecular por un electrón que puede provenir del transporte de electrones en la mitocondria, del retículo endoplásmico o de la acción enzimática de diversas enzimas como la NADPH oxidasa. El $\bullet\text{NO}$ proviene de la reacción enzimática de la NOS (Tomada de Chirino et al, 2006).

1.5. Sistemas antioxidantes

Un antioxidante con función biológica es cualquier sustancia que retarda, previene o remueve significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2015). En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción (Ames et al, 1993). Los antioxidantes se han clasificado de acuerdo a su estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos.

1.5.1. Antioxidantes enzimáticos

Es bien sabido que las defensas antioxidantes evitan la reducción univalente del O_2 (Krinsky, 1992). Los antioxidantes enzimáticos son un grupo de enzimas que inactivan las ERO, como es el caso de las superóxido dismutasas (Cu-SOD y MnSOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), entre otras. Además, la célula cuenta con enzimas que se encargan de detoxificar compuestos electrofílicos, conocidas como enzimas de fase II, como la familia de las enzimas de la glutatión-S-transferasa (GST). Los mecanismos de detoxificación involucrados son los siguientes:

a) SOD: los oligoelementos cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn) forman parte de la estructura proteica de la SOD que es una metaloenzima, estos oligoelementos dan lugar a tres tipos de SOD en mamíferos las cuales están localizadas en lugares específicos. La SOD 1 o Cu/Zn-SOD que contiene cobre y zinc se ubica en el citoplasma y en el espacio inter-membranoso mitocondrial, la SOD 2 o Mn-SOD contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial y la SOD 3 o Cu/Zn-SOD que al igual que la SOD 1 contiene cobre y zinc, pero está localizada en el fluido extracelular. Una de las funciones más importantes de la SOD es catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , para lo que no requiere de co-sustratos. Su principal función es la protección contra el $O_2^{\cdot-}$ (Gómez-Quiroz y Cuevas-Bahia, 2008; Jaramillo et al, 2005; Venereo, 2002).



b) La GPx es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (LOOH), y utiliza como agente reductor al glutatión (GSH). Los productos de reacción son el glutatión disulfuro (GSSG) y el agua (Reacción 2) (Maiorino et al, 1991; Powers y Lennon, 1999). Está presente en varias isoformas, entre las que se encuentran: la GPx plasmática, la GPx citosólica y la GPx de fosfolípidos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Esta enzima se encuentra dentro de las enzimas reguladas por la activación del factor de transcripción Nrf2 (Thimmulappa et al, 2002).



c) La Glutati3n reductasa requiere NADPH y cataliza la conversi3n de GSSG a GSH, esta enzima es esencial para el ciclo redox (Harris y Massey, 1997).

d) Las GST son una familia de enzimas que poseen dos isoformas: las GST citos3licas y las GST microsomales, su funci3n primaria es catalizar la conjugaci3n del GSH con una gran cantidad de compuestos org3nicos. Las GST pueden reducir hidroper3xidos de l3pidos por medio de una actividad de GPx independiente de selenio; tambi3n pueden detoxificar al 4-hidroxinonal, un producto final de la peroxidaci3n de l3pidos (Sharma et al, 2004).

e) La CAT es una hemoprote3na que se concentra principalmente en los peroxisomas y las mitocondrias, su papel antioxidante consiste en disminuir la formaci3n del radical •OH por la interacci3n del H₂O₂ con metales de transici3n v3a la reacci3n de Fenton (Halliwell, 1999). Su mecanismo catal3tico tiene lugar en dos fases: en la primera se lleva a cabo la degradaci3n de una mol3cula de H₂O₂ y se genera una mol3cula de agua, en la segunda reacciona la especie oxoferrilo con otra mol3cula de H₂O₂ (Putnam et al, 2000) Reacci3n 3.



1.5.2. Antioxidantes no enzim3ticos

Algunos de los antioxidantes no enzim3ticos son: el GSH, algunos minerales como el zinc, el selenio o vitaminas como la riboflavina, el 3cido asc3rbico (vitamina C) y el α-tocoferol (vitamina E). Estos son fundamentales para la defensa contra el da3o oxidante ya que act3an como cofactores de enzimas antioxidantes (Krinsky, 1992).

Dentro de los sistemas no enzim3ticos destacan:

a) Vitamina E (α-tocoferol): se considera el antioxidante que est3 m3s distribuido en los seres vivos. Interrumpe la peroxidaci3n de l3pidos en la fase de propagaci3n reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcoxilos. Los tocoferoles al reaccionar con los radicales peroxilos lip3dicos producen hidroper3xidos lip3dicos estables. Los radicales tocoferilos interrumpen la reacci3n radicalica en cadena, evitando de esta manera la lipoperoxidaci3n. (Burton et al, 1982; Halliwell y Gutteridge, 2006)

b) Vitamina C (ácido ascórbico): se encuentra distribuido intra- y extracelularmente, reacciona en forma directa con el $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ (Frei et al, 1990; Sauer et al, 2001), lo que produce al radical ascorbilo, el cual es reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (May et al, 1998).

c) Glutati3n: es el tiol no proteico m1s abundante en las c3lulas de mam3feros (Jocelyn, 1972). El glutati3n se puede encontrar de dos formas, seg3n su estado de 3xido-reducci3n; como GSH, o como GSSG. El GSSG est1 compuesto por dos mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las ciste3nas. Su forma reducida se considera como un compuesto antioxidante debido a que impide la oxidaci3n de los grupos $-SH$ de las prote3nas y tiene la capacidad de reaccionar con las ERO transfiri3ndoles un 1tomo de hidr3geno (Halliwell y Gutteridge, 2006). Lo anterior enfatiza la importancia de consumir como parte de nuestra dieta, alimentos que contengan antioxidantes ex3genos para prevenir el EO.

1.6. El Factor de transcripci3n Nrf2

Las ERO y ERN desempe1an papeles importantes en diversas v3as metab3licas y de se1alizacion, por lo que la presencia de estas especies es indispensable para el funcionamiento adecuado de las c3lulas. Las ERO y ERN deben encontrarse en un balance para preservar la homeostasis celular. En caso de un aumento en las especies oxidantes y de una disminuci3n en las antioxidantes o viceversa las c3lulas han desarrollado programas din1micos para contener el estr3s causado por estas mol3culas. Hasta la fecha se han descrito m1s de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante. Entre los factores de transcripci3n que se activan por ERO y ERN destacan el factor nuclear κB (NF κB), la prote3na activadora 1 (AP1) y el factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (NFE2L2) conocido como Nrf2 (K3nigsberg, 2007).

1.6.1. Factor de transcripción Nrf2 y la vía Keap1/Nrf2/ARE

La inducción de la respuesta de fase II protege a las células contra el daño ocasionado por el estrés oxidante. El análisis genómico de las secuencias de sus promotores ha revelado que coinciden en una secuencia específica de unión llamada elemento de respuesta antioxidante (ARE).

Los ARE actúan en cis con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA- 3', en genes que codifican para enzimas de fase II, de desintoxicación y proteínas antioxidantes como la NAD(P)H: quinona óxidorreductasa (NQO1), la GST y la glutamato cisteína ligasa (γ GCL), entre otras. El Nrf2 forma complejos con la secuencia ARE, lo que regula un amplio grupo de genes antioxidantes y destoxificantes en diversos tipos de células (Lee y Johnson 2004).

El Nrf2 forma parte de una familia de proteínas básicas que se caracteriza por tener un cierre de leucinas (bZip) o "zipper" en la región C-terminal. La región básica de Nrf2 es la responsable de la unión al DNA, mientras que la región ácida se requiere para su activación transcripcional. El Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, de modo que su actividad se mantiene estrictamente reguladas, tiene un peso molecular de 95-110 kDa (Lau et al, 2013).

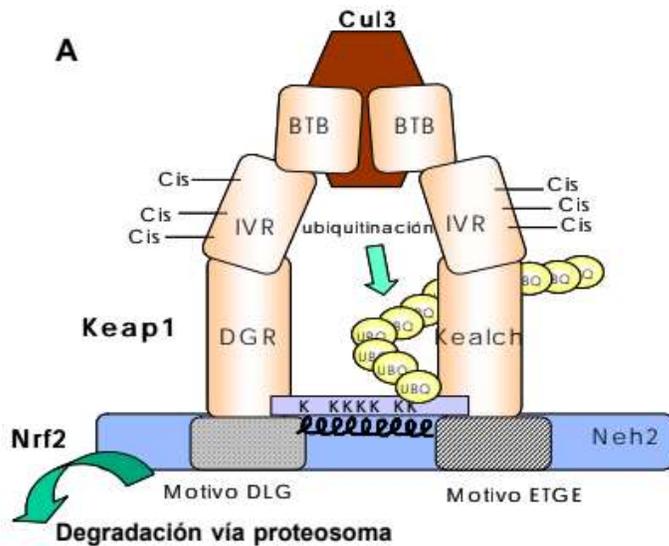
Diversos estudios in vitro y en sistemas celulares de mamíferos llevaron a la identificación de la proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch (Keap1), que suprime hasta en un 80% la traslocación nuclear y la actividad transcripcional de Nrf2. El Nrf2 en condiciones basales se encuentra unido a la proteína Keap1 reprimiendo su actividad, esta interacción es insuficiente para mantener a Nrf2 en el citosol y se ha descrito que Keap1 se asocia al mismo tiempo con el citoesqueleto (Copple et al, 2008).

La degradación de Nrf2 es un evento que no necesita modificaciones post-transcripcionales del sustrato debido a que Keap1 funciona como un adaptador de sustratos para el proteosoma. En cuanto a este mecanismo es importante mencionar que su selectividad y especificidad están dadas por una proteína llamada ubiquitina que se une a las proteínas que se van a degradar. Estas proteínas ubiquitinadas son reconocidas por un complejo conocido como proteosoma 26S que desdobra y digiere a las proteínas. Este proceso de poliubiquitinación y

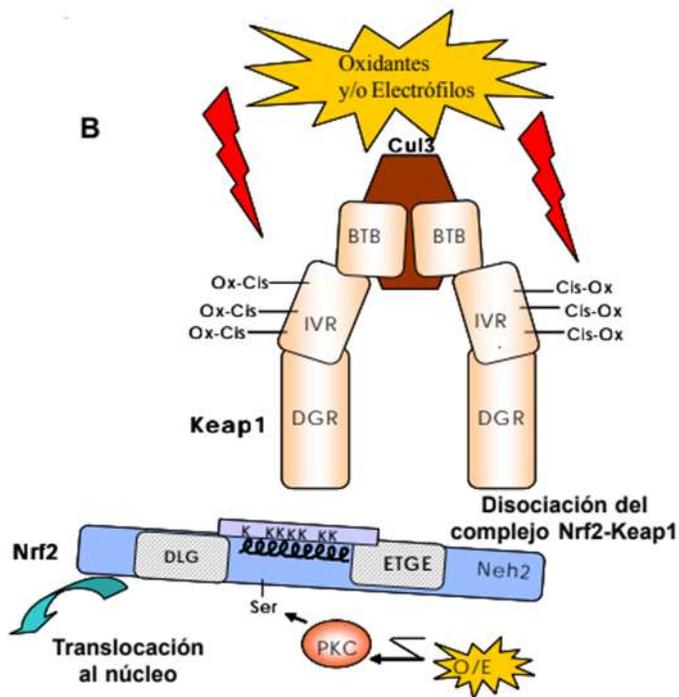
reconocimiento del sustrato requiere de la participación de varias enzimas: las E1 que activan la ubiquitina, las E2 que conjugan la ubiquitina y las E3 que unen la ubiquitina (Cullinan et al, 2004)

Keap1 es un adaptador que une a Nrf2 con Cul-3, una proteína adaptadora del complejo E3 ubiquitina ligasa (Cullinan et al, 2004). De esta manera la activación de Nrf2 y su translocación al núcleo dependen directamente de su disociación de Keap1, que es fomentada por el estrés oxidativo. Las cisteínas responsables de la transformación estructural de Keap1 y de la liberación de Nrf2, aunque hasta la fecha no se ha determinado con certeza cuales son las cisteínas que se modifican como respuesta a los electrófilos e inductores de estrés. Se han sugerido como posibles candidatos a la cisteína 183, o bien las cisteínas 273 y 288. Se han propuesto 7 residuos de cisteína cuyos tioles se oxidan o se modifican covalentemente, lo que permite la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (Figura 5) (Königsberg, 2007).

Figura 5. Modelo de activación de Nrf2



A) La homodimerización de Keap1 facilita la interacción de Cul3 con los dominios BTB e IVR, lo cual induce la ubiquitinación de los residuos de lisina de Nrf2 y promueve su degradación vía el proteosoma. (Tomada de Königsberg, 2007)



B) La presencia de agentes oxidantes y/o electrófilos oxida los sulfhidrilos de las cisteínas en el dominio IVR de Keap1, promoviendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1. Los oxidantes y/o electrófilos también inducen la fosforilación del residuo de serina 40 de Nrf2, y todos estos eventos culminan en la eventual translocación de Nrf2 al núcleo. (Tomada de Königsberg, 2007)

1.7. La vía de la Kinurenina (VK)

El Trp es uno de los 20 aminoácidos esenciales y sirve como precursor para la síntesis de proteínas. La ruta catabólica del Trp en el cerebro de mamíferos, riñón e hígado es la VK (Moroni et al, 1988) (Figura 6). En condiciones fisiológicas se encarga de la síntesis de novo de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) (Beadle et al, 1947), el cual es un acarreador de electrones que se reduce reversiblemente a NADH por la adición de dos electrones y un protón en el anillo de nicotinamida (Ussher et al, 2012).

En el torrente sanguíneo el 90% del Trp se encuentra libre mientras que el 10% restante se une a la albúmina. Solamente en su forma libre atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) con la ayuda de un transportador de aminoácidos tipo L no específico y competitivo. De la fracción de Trp que atraviesa la BHE y llega al encéfalo, el 95% se degrada por la VK y el 5% restante es metabolizado por la vía metoxindol para la biosíntesis de serotonina y melatonina (Jones et al, 2014).

La vía inicia con la degradación del Trp en formilkinurenina por las enzimas indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1 e IDO2, expresada en monocitos, macrófagos, microglía, astrocitos, neuronas y en algunos tipos de células troncales) o por la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO, expresada en hígado) (Lovelace et al., 2016). La formilkinurenina se metaboliza en kinurenina (KYN) por la kinurenina formilasa. La Kinurenina es el metabolito central de la vía, en su metabolismo actúan tres enzimas diferentes: primero, la kinureninasa forma el ácido antranílico (ANA); segundo, la aminotransferasa (KAT, expresada en astrocitos) forma el ácido kinurenico (KYNA); y el tercer metabolito se produce en condiciones inflamatorias por la acción la enzima kinurenina 3-hidroxilasa (en microglia) a 3-hidroxikinurenina (3-HK) (Vamos et al, 2010, Braidy et al, 2011)

El ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) se produce a partir de dos enzimas: Cuando su precursor, es el ANA se metaboliza por la ácido 3-hidroxiantranílico hidrolasa, en tanto que si el precursor es 3-HK actúa la enzima kinureninasa. La 3-HK es catalizada por la enzima ácido 3-hidroxiantranílico 3,4-dioxigenasa (3-HAO) para formar otro metabolito estable, el 2-amino 3-carboximucionato 6-semialdehído (ACMS) el cuál seguirá dos vías más: primero, de la enzima 2-amino 3-

carboximucionato 6- semialdehído descarboxilasa (ACMSD) formará el precursor 2-aminomuconato 6- semialdehído (AMS), y por una reacción espontánea formará el ácido picolínico (AP); y por otro lado, el ACMSD va a sufrir una ciclización no enzimática para formar el QUIN. Finalmente, el QUIN es degradado por la enzima ácido quinolínico fosforribosiltransferasa (QPRT) para formar NAD⁺ (Vamos et al, 2010, Braidy et al, 2011). Esta vía produce tres intermediarios con propiedades neuroactivas, el KYNA, la 3-HK y QUIN, a continuación, se muestra su representación simple (Figura 6) (Schwarcz y Pellicciari, 2002).



Figura 6. Principales reacciones y enzimas de la vía de la kinurenina en células de mamíferos, como una vía para la síntesis de NAD⁺. El recuadro rojo señala una de las kinureninas neuroactivas relevantes para este trabajo, el QUIN. Esquema basado en Bohár et al, 2015; Parrot y O'Connor 2015; Stone, 2001.

1.7.1. Ácido quinolínico y mecanismo de excitotoxicidad

El QUIN o ácido 2,3-piridina-dicarboxílico es un metabolito neuroactivo endógeno de la VK y es el precursor directo para la formación de NAD⁺. Se sintetiza en la microglía en el estado activo por medio de laIDO como respuesta a un evento inflamatorio mediante IFN- γ y TNF α en el SNC (Stone, 1993; Dantzer et al, 2008; Schwarcz et al, 2012). Actúa como agonista selectivo de los rNMDA, induce una sobre estimulación que activa al receptor, permite el paso de Ca²⁺, genera un evento neurotóxico y conduce a la muerte neuronal (Köhler y Schwarcz, 1983).

El QUIN generalmente se encuentra en el cerebro a concentraciones nanomolares (50-1000 nM) (Wolfensberger et al, 1983). Un factor que contribuye a su incremento extracelular, es la disminución en la expresión de la enzima que lo degrada (QPRT, en astrocitos y células endodiales); esta acumulación del metabolito favorece eventos excitotóxicos (Jhamandas et al, 1992).

El QUIN es un análogo del GLU que produce eventos excitotóxicos cuando sus niveles basales se incrementan, este metabolito actúa como agonista selectivo de los rNMDA, al competir por el sitio de unión a GLU. La unión del QUIN al receptor no excluye la presencia del GLU, ambas moléculas permiten la activación continua del receptor y esto mantiene el flujo intracelular del Ca²⁺ de forma masiva (Schwarcz et al., 1984). Este ion actúa como segundo mensajero y activa fosfolipasas, cinasas, proteasas, endonucleasas, citocromo C, calpains; también incrementa la expresión de NOS, disminuye la expresión de la SOD, lo cual favorece el incremento ERO y/o de ERN (Stone et al, 2012), y conduce a la activación de caspasas. En conjunto esto induce la muerte celular por apoptosis o necrosis (Figura 7) (Pérez-De la Cruz et al., 2012).

El efecto tóxico del QUIN también está relacionado con la capacidad para formar ERO. En el espacio extracelular el QUIN puede formar complejos con Fe²⁺, y promueve la reacción de Fenton lo que induce la formación de ERO, especialmente de •OH (Pérez-De la Cruz et al., 2012). Además, el QUIN incrementa la concentración de GLU al bloquear sus transportadores en células gliales y evitando la recaptura del neurotransmisor para que se degrade, potenciando el efecto tóxico del QUIN (Pérez-De la Cruz et al, 2012).

En conjunto, la vía KYN implica metabolitos cuyos efectos primarios pueden estar mediados a través de sistemas glutamatergicos y, por tanto, podrían representar dianas farmacológicas para modular la neurotransmisión glutamatergica (Dantzer et al, 2011; Schwarcz et al, 2012; Stone et al, 2012; Vecsei et al, 2013).

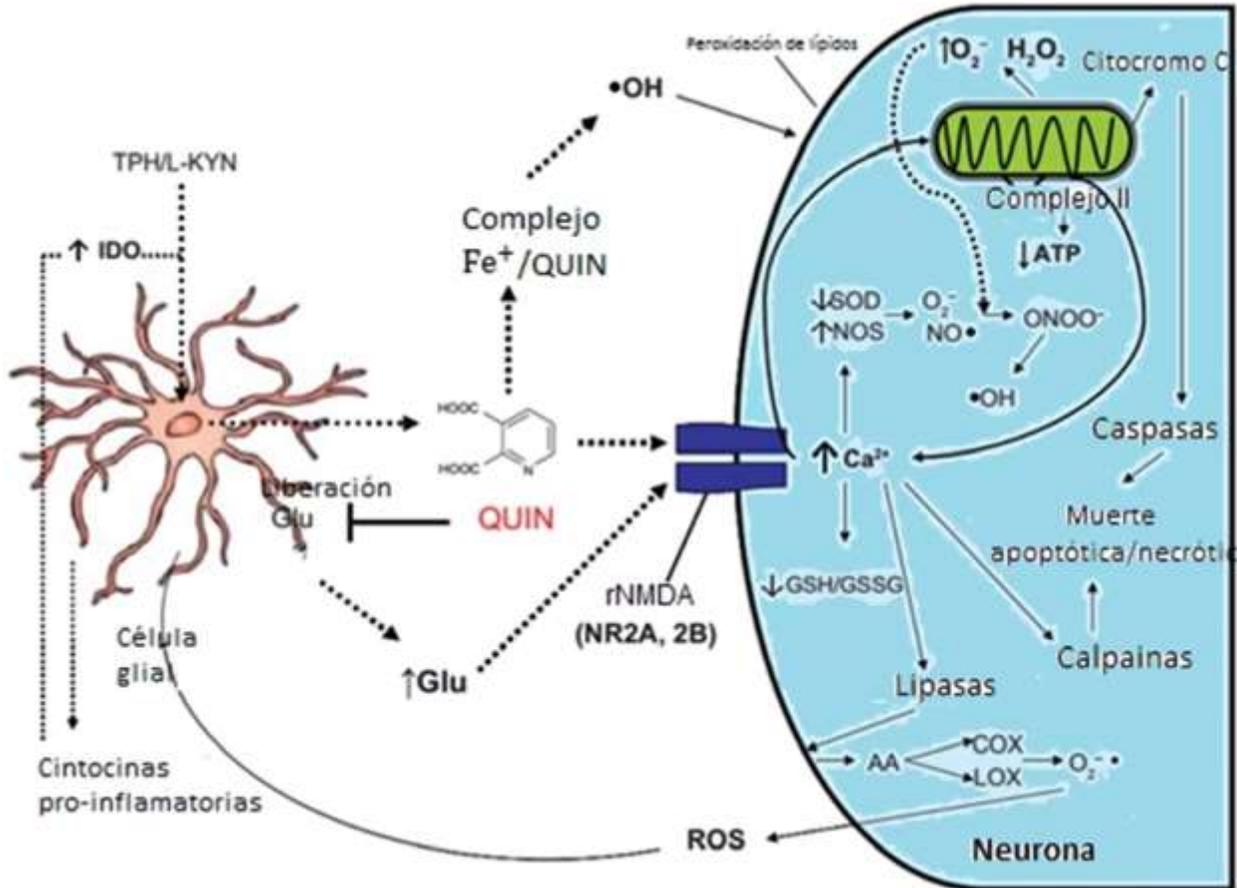


Figura 7. Representación de los mecanismos excitotóxicos mediados por el ácido quinolínico QUIN.

El QUIN actúa como agonista de GLU en el sitio de unión de los NMDAr, lo que genera una sobre-estimulación y permite la entrada masiva de Ca^{2+} para activar diferentes vías de señalización intracelular. A nivel extracelular, forma el complejo $Fe^{2+}/QUIN$ que favorece la formación de ERO e induce estrés oxidativo. Finalmente, en las células gliales, inhibe la recaptura de GLU y potencia el efecto excitatorio (Imagen tomada con de Pérez-De la Cruz et al, 2012).

1.8. Microglía y su papel en la modulación de glutamato y citocinas inflamatorias

La microglia son las células inmunitarias que funcionan dentro del parénquima cerebral fuera de los límites de la circulación periférica. La actividad microglial y su morfología es muy sensible al contexto y depende de la distribución espacial y temporal de las influencias fisiológicas o patógenas (Fenn et al, 2014; Figuera-Losada et al, 2014; Kettenmann y Ransom, 2012; Reus et al, 2015; Torres-Platas et al, 2014a; Torres-Platas et al, 2014b).

Durante el estado de vigilancia, la microglia no expresa receptores o transportadores de GLU. Sin embargo, tras su activación, la microglia expresa receptores y transportadores de este aminoácido (EAAT y xC) en su superficie. La activación los receptores AMPA y kainato ubicados en la microglia estimula la producción y liberación de citocinas como el TNF α (Noda et al, 2000; Verkharatsky y Butt, 2014). La activación de los receptores mGluR2 de la microglia promueve la neurotoxicidad a través de la liberación adicional de citocinas inflamatorias, GLU y NO (Piers et al, 2011; Taylor et al, 2005). Aunado a lo anterior, numerosos estudios implican al TNF en el aumento de la liberación de GLU microglial. El TNF α aumenta los niveles extracelulares de dicho neurotransmisor al inducir la liberación de éste en la microglia (Takeuchi et al, 2006) y los astrocitos (Bezzi et al., 2001; Petrelli y Bezzi, 2016). El mecanismo de liberación de GLU por la microglia está relacionado con una mayor expresión de la enzima glutaminasa (que convierte la glutamina en GLU), lo que indica que las células gliales activadas por el sistema inmunitario sintetizan activamente este neurotransmisor de una manera similar a las neuronas (Takeuchi et al, 2008). Además, el GLU absorbido por los transportadores de superficie de la microglía activada también se transmite al citoplasma astrocítico a través de uniones gap de conexina entre las células microgliales y astrocíticas, lo que conduce aún más a la disminución del funcionamiento y la expresión de EAAT

astrocíticos, promoviendo daño excitotóxico generalizado (Takeuchi et al, 2008; Takeuchi et al, 2006) como se muestra a continuación figura (figura 8).

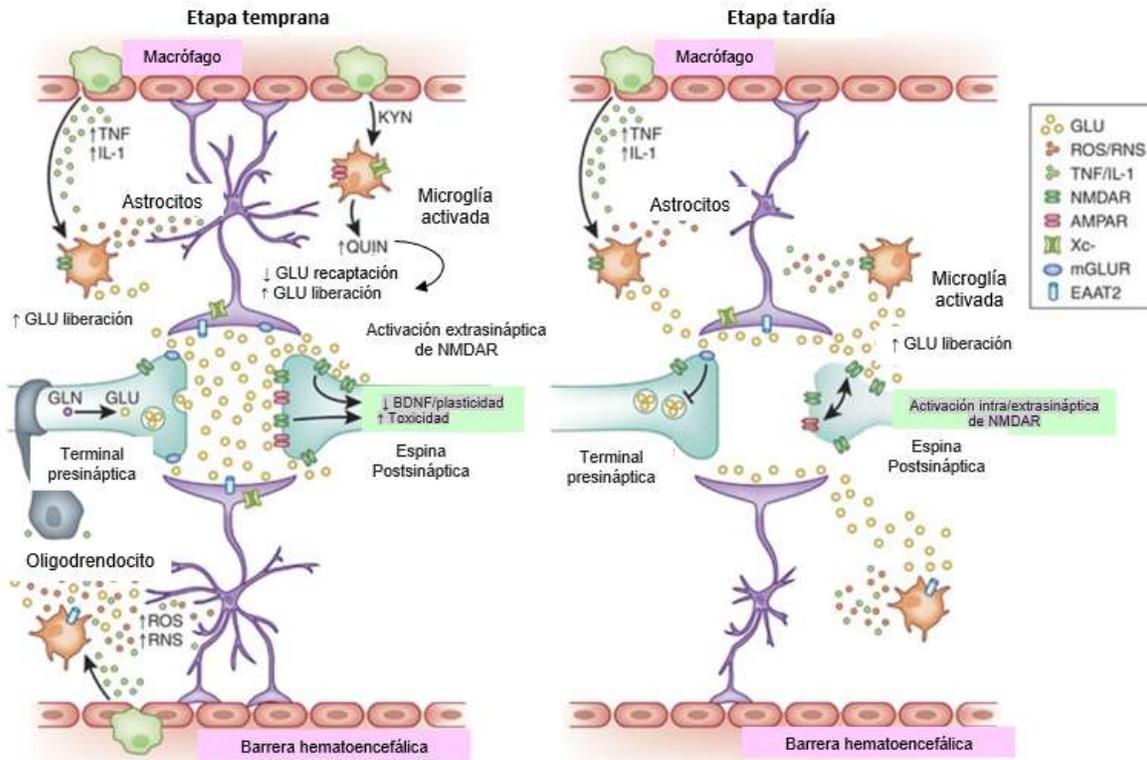


Figura 8. Impacto de la inflamación en la neurotransmisión del glutamato y la integridad sináptica.

El panel de la izquierda muestra la sinapsis glutamatérgica en una etapa temprana de la inflamación. Niveles elevados de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleucina (IL) -1 β liberadas por las células inflamatorias activadas, incluidas la microglía, la astrología y los macrófagos, aumentan la concentración de glutamato sináptico (GLU), así como del ácido quinolínico (QUIN), que en conjunto con las ERO y las ERN provocan EO. Los efectos de las moléculas inflamatorias sobre la morfología de las células astrocíticas conducen a una disminución de la capacidad de secuestrar y contener el GLU dentro de la sinapsis, lo que resulta en un derrame del mismo en el espacio extrasináptico. La disminución simultánea en el número y funcionamiento de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) 2 inducidos por la inflamación limitan aún más la capacidad de los astrocitos para amortiguar y eliminar el glutamato desbordado. La liberación adicional de glutamato por el aumento de la actividad del transportador de aminoácidos heteromérico (Xc⁻) solo o en combinación con la liberación de eflujo inverso a través de EAAT por las células gliales activadas por el sistema inmunitario aumenta aún más sus concentraciones extrasinápticas. Se ha demostrado que el aumento sináptico de este neurotransmisor como resultado de los cambios inflamatorios tempranos conducen a la sobreactivación de receptores ionotrópicos intrasinápticos como AMPA y NMDA

que potencialmente contribuyen a la excitotoxicidad. También se muestra que el GLU desbordado se une a los receptores NMDA extrasinápticos que conducen a la supresión del soporte neurotrófico de factores como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). En el panel derecho se observa la sinapsis del GLU en una etapa tardía de la inflamación crónica. La progresión de la disfunción glutamatérgica ha resultado en una pérdida general de su neurotransmisión. La estimulación sostenida de los receptores presinápticos mGluR2 / 3 mediante la difusión del glutamato a través del espacio extrasináptico conduce a la inhibición de la neurotransmisión excitadora y al aumento del atrapamiento del GLU en las vesículas dentro de la membrana presináptica. El efecto tóxico de la sobreestimulación del AMPA intrasináptico durante la activación inmune temprana conduce a una disminución de la regulación, desensibilización y pérdida atrófica de estos receptores. Lo anterior conduce a la pérdida de la señalización de NMDA intrasináptica incluso cuando la señalización de NMDA extrasináptica sigue siendo alta. Esta relación alterada de señalización intrasináptica a extrasináptica conduce a atrofia y pérdida regional de neuronas. Finalmente, el aumento de GLU extrasináptico continuo, el incremento de ERO / ERN y QUIN también contribuyen a la toxicidad de los astrocitos y oligodendrocitos, lo que también conduce a cambios atróficos en estas células (Imagen modificada de Haroon et al, 2016).

1.9. S-alilcisteína

El *Allium sativum*, conocido comúnmente como ajo, está constituido por alrededor de 30 sustancias principales, el compuesto organosulfurado que se encuentra en mayor proporción es la SAC, la cual es muy estable debido a sus propiedades fisicoquímicas (se sabe que permanece de forma inalterada en solución acuosa por 2 años), es un polvo blanco cristalino, de olor característico, no higroscópico y con un punto de fusión de 223.3-223.7°C (Kodera et al, 2002; Lawson, 1998). Los efectos biológicos del extracto de ajo envejecido son atribuidos a este compuesto, aunque la SAC también se puede encontrar en otras presentaciones del ajo como un constituyente minoritario en el ajo intacto (no más de 30 µg/g en peso fresco) (Colín-González et al, 2012; Kodera et al, 2002), el ajo triturado (Yan y Zeng, 2005) y la cebolla (Hsu et al, 2006).

La SAC se puede formar de dos maneras; por medio de una reacción enzimática a partir del catabolismo de la γ -glutamyl-S-alilcisteína a SAC mediante la enzima γ -glutamyltransferasa (Kodera et al, 2002), o a partir de una síntesis química entre la L-cisteína y el bromuro de alilo (Maldonado et al, 2003; Nagae et al, 1994).

1.9.1. Efecto biológico de SAC

La SAC ejerce diversos efectos farmacológicos en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades (Ray et al, 2011). Se ha descrito que la SAC tiene un gran número de propiedades antioxidantes estudiadas en modelos *in vitro* e *in vivo*. Estas propiedades la incluyen como un agente hepatoprotector, cardioprotector, quimiopreventivo, neuroprotector, entre otros (Mostafa et al, 2000; Maldonado et al, 2003; Cruz et al, 2007; García et al, 2008). Los mecanismos mediante los cuales la SAC ejerce propiedades antioxidantes son: (figura 9) (Colín-González et al, 2012):

- Atrapador de radicales libres (ERO y ERN), de tal forma que actúa como un antioxidante directo.
- Transactivador del factor Nrf2 y subsiguiente activación de la respuesta de fase II, actuando como un antioxidante indirecto.
- Inhibidor de enzimas pro-oxidantes (xantina oxidasa, ciclooxigenas, y NADPH oxidasa).
- Quelante de metales como Fe^{2+} y Cu^{2+} , lo que evita que se lleve a cabo la reacción de Fenton.
- Inhibidor de la translocación de NF- κ B hacia el núcleo, de tal forma que evita la señalización apoptótica.

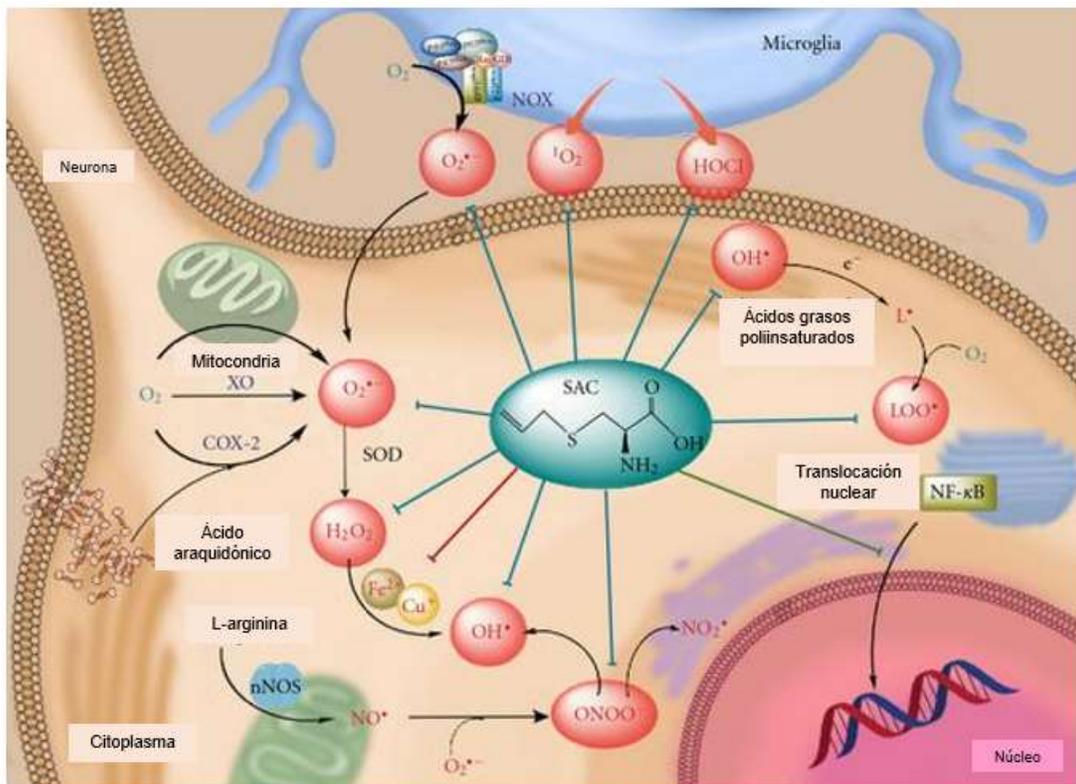


Figura 9. Representación de los mecanismos protectores mediados por la SAC.

Mecanismo antioxidante asociado a la S-allicisteína (SAC). La SAC puede eliminar el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH\bullet$), el radical peroxinitrito ($ONOO^-$) y el radical peroxilo ($LOO\bullet$) producido en las células neuronales, así como ácido hipocloroso ($HOCl$) y oxígeno singlete (1O_2) producido en las células microgliales (líneas azules). Además, SAC también exhibe propiedades quelantes sobre iones Fe^{2+} y Cu^{2+} (línea roja), lo que evita se lleve a cabo la reacción de Fenton. SAC también inhibe la translocación de NF- κ B hacia el núcleo (línea verde), lo cual evita la señalización apoptótica. COX-2: ciclooxigenasa-2, NOX: NADPH oxidasa, nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal, SOD: superóxido dismutasa, XO: xantina oxidasa (Imagen tomada de Colín-González et al, 2012).

Como se mencionó anteriormente el Nrf2 regula la expresión inducible de un gran número de genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, de esta manera ofrece un efecto protector en modelos de estrés oxidante. La disminución de este factor es prevenida por la SAC, ya que es capaz de activarlo en diferentes órganos como el cerebro, el hígado y el riñón (Gómez-Sierra et al, 2014).

La SAC previene la disminución de los niveles del factor de transcripción Nrf2 y de las enzimas Mn-SOD y hemo-oxigenasa (HO-1) en animales tratados con MPTP (Nishiyama et al, 2001), así como la respuesta inflamatoria provocada por esta toxina. En modelos experimentales de la enfermedad de Huntington se encontró que el tratamiento previo con SAC atenuó la neurotoxicidad provocada por la administración de QUIN en el estriado en ratas (Pérez-Severiano et al, 2004); disminuyó la lipoperoxidación y la disfunción mitocondrial mediada por la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (Herrera-Mundo et al. 2006; Pérez-De La Cruz et al, 2006), y redujo la lipoperoxidación evocada por el QUIN en sinaptosomas de cerebro de ratas (Pérez-De La Cruz et al, 2006; Elinos-Calderón et al, 2010). Tomando en cuenta lo anteriormente descrito, la SAC es un antioxidante prometedor, por lo que resulta conveniente seguir investigando los mecanismos bajo los que ejerce su papel protector y las vías de señalización celular que pudiera estar modulando para efectuar dicha protección.

1.10. Vías metabólicas de señalización

Existen diversas vías de señalización del sistema inmune, cuya función es transmitir la información del exterior de la célula al citoplasma y al núcleo. Dicha información se transmite de varias maneras, por ejemplo, mediante la activación de las vías metabólicas proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y fosfatidilinositol 3-cinasa/proteína Akt (PI3K/Akt), implicadas en la respuesta frente al EO y que dan lugar a la supervivencia celular o a la apoptosis, dependiendo de los niveles de ROS/RNS.

Hay tres familias clásicas que constituyen las tres rutas principales de MAPK. La ruta de las cinasas reguladas extracelularmente (ERK 1/2, extracelular signal-regulated kinase), las cinasas p38 y las c-Jun N-terminal cinasa (JNK). En condiciones de estrés oxidativo moderado, la vía de señalización ERK 1/2 promueve la supervivencia celular, mientras que las vías JNK y p38 inducen la muerte celular (Matsuzawa et al, 2005). Considerando que el EO mediado por las ERO generan cambios en la regulación de las vías de señalización, este trabajo se centra en observar si el mecanismo protector de la SAC implica la modulación de la vía de ERK.

1.10.1. Vía de ERK

Las vías ERK regulan principalmente procesos de crecimiento y diferenciación celular, por lo que su activación se lleva a cabo en respuesta a estímulos mitogénicos, inducidos principalmente por citocinas y factores de crecimiento. También se pueden activar por estrés oxidativo, lo que genera la estimulación de los receptores tirosina cinasa, los cuales activan a la proteína RAS mediante modificaciones tiol (glutathionilación o S-nitrosilación). RAS, una vez activada, fosforila y activa de forma secuencial las cinasas MEK 1/2 y ERK 1/2, produciéndose la translocación de esta última al núcleo, lo que permite la regulación de diferentes factores de transcripción y estimula así la supervivencia celular (Lander et al, 1997).

1.11. Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos (FNs) son proteínas que regulan el crecimiento axonal, la plasticidad sináptica, la neurotransmisión, y la expresión de proteínas sinápticas (Birling y Price, 1995; Gary y Barde, 1996; Huang y Reichardt, 2001; Tartaglia et al, 2001; Thoenen, 1995). Se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la diferenciación y supervivencia de las neuronas, algunos FNs también están activos en tejidos embrionarios no neuronales, o se pueden liberar durante la edad adulta en caso de regeneración tisular, neuroprotección y plasticidad (Thoenen, 2000; Schinder y Poo, 2000). Cabe destacar que la expresión de estos factores se puede ver disminuida o incrementada como consecuencia de una enfermedad, trauma, inflamación, infección o crecimiento tumoral. (Gary y Barde, 1995; Ying et al, 2003).

Entre los factores neurotróficos destacan las neurotrofinas (NTs), estas proteínas endógenas sirven como moduladoras de procesos antiapoptóticos, pero que a la vez promueven la sinaptogénesis, el mantenimiento, la diferenciación, la supervivencia neuronal, la axogénesis y la dendrogénesis (Chan et al, 2001; Huang y Reichardt, 2001; Snider et al, 1994). De igual forma, se ha evidenciado su papel en procesos de regeneración en distintos tejidos (Xiao y Le, 2016).

1.11.1. Neurotrofinas

Las NTs ejercen sus acciones biológicas principalmente sobre células del sistema nervioso (Gary y Barde, 1996) aunque existe evidencia que demuestra que estas moléculas actúan en otros sistemas y tejidos, como el músculo esquelético donde también realizan acciones tróficas (Gary y Barde, 1996). Esta familia de polipéptidos está relacionada entre sí, y se sabe que cumplen diferentes funciones neuronales como supervivencia, migración, diferenciación, desarrollo y plasticidad (Salehi et al, 2003; Salehi et al, 2004; Sofonriew et al, 2001). Son sintetizados inicialmente en su forma inmadura como pre-pro-proteína. En los mamíferos se han identificado 4 NTs, las cuales incluyen al Factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4) (Barde et al, 1978; Honh et al, 1990; Levi y Hamburguer, 1951). Todas estas NTs tienen un

papel esencial en la diferenciación neuronal y plasticidad sináptica en varias regiones cerebrales relevantes para el aprendizaje y la memoria (McAllister et al, 1999), pero para que realicen sus acciones tróficas deben de unirse en la membrana citoplasmática a dos diferentes receptores, uno de ellos de alta afinidad tipo tirosina cinasa (Trk, del inglés *Tirosyne Kinase*), al que se unirán en su forma madura, y otro de baja afinidad (p75NTR) al que se acoplarán en su estado inmaduro (pro-neurotrofina) (Curtis et al, 1995; Villanueva, 2013).

1.11.2. Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) es un homodímero de un peso molecular de 27 KD que puede cruzar la BHE y posteriormente ser almacenado en las plaquetas (Pan et al, 1998; Poduslo y Curran, 1996).

Su síntesis se realiza en el RE como una proteína precursora (pre-proBDNF), que posteriormente será proteolíticamente escindida de dos formas, constituyendo dos proteínas distintas tanto estructural como funcionalmente: la forma truncada (pro-BDNF), de 28 KDa, y la forma madura (BDNF) de 14 KDa (Mowla et al, 2001). El BDNF maduro es considerado la forma activa de esta molécula la cual posee dos receptores, uno de baja afinidad (p75) y otro de alta afinidad llamado receptor de tropomiosina relacionado a la cinasa B (TrkB) (Besser y Wank, 1999; Hempstead, 2006; Klein et al, 1991).

Tanto el BDNF como su receptor de alta afinidad están presentes en axones terminales presinápticos y en compartimientos dendríticos postsinápticos en las neuronas (Tyler et al, 2002), así como en el músculo esquelético (Shelton et al, 1995).

Aunque se ha documentado que esta neurotrofina puede ser producida en tejidos periféricos como el músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, músculo liso bronquial, tejido ovárico, células endoteliales y del sistema inmune (Cassiman et al, 2001; Kawamura et al, 2005; Kermani y Hempsten, 2007; Kerschensteiner et al, 1999; Lommatzsch et al, 1999; Matthews et al, 2009), es importante destacar que el cerebro sintetiza más del 75 % en condiciones normales (Rasmussen et al, 2009).

El BDNF se ha descrito como promotor de varios aspectos del desarrollo cerebral (McAllister et al, 1991; Garaflos et al, 2005; Greenberg et al, 2009; Jonson-Farley et al, 2007; Park y Poo, 2013) los cuales son mediados por su receptor TrkB en el hipocampo y la corteza cerebral (Christie et al, 2008), y llevados a cabo a través de complejas vía de señalización como PI3K/Akt, ERK1/2, PLC y las vías de Ras (Brunet et al, 1999; Luikart et al, 2008), las cuales promueven la supervivencia neuronal y convergen en el regulador transcripcional CREB (del inglés *cAMPResponse Element Binding Protein*) (Shaywitz y Greenberg, 1999; Gass y Riva, 2009), el cual se sabe que inhibe la apoptosis, previene la neurodegeneración y modula la expresión de genes relacionados con la función cognitiva (Balogh et al, 2014; Jain et al, 2013; Ortega, 2015). Si bien se han mencionado los fenómenos fisiológicos en los que BDNF interviene de forma positiva, también es oportuno señalar que se ha descrito una disminución de sus concentraciones con el paso de los años, lo que aumenta el riesgo de sufrir patologías neurodegenerativas como enfermedad de Parkinson, Alzheimer, demencia y deterioro cognitivo leve (Komulainen et al, 2008; Webster et al, 2006; Yasutake et al, 2006).

1.12. Receptores Trk

La familia de los receptores de tirosina cinasa tienen especial preferencia por una o más NTs, en donde el receptor TrkA es a fin por NGF, TrkB a BDNF y NT-4, y TrkC a NT-3 (Tyler et al, 2002). Sin embargo, a pesar de su especificidad, estos receptores pueden expresar afinidad, en menor medida, por otras neurotrofinas. Por ejemplo, se ha determinado que TrkB también puede interactuar con NT-3, mientras que TrkA haría lo mismo con NT-3 y NT-4 (Berkemeier et al, 1991; Squinto et al, 1991) (Figura 10).

Al enlazarse a su receptor de alta afinidad, las NTs serán llevadas hasta el soma mediante transporte axonal retrógrado, donde iniciarán diversos efectos promotores crecimiento neuronal, plasticidad sináptica, mielinización, diferenciación, supervivencia, mediante la activación de varias vías de señalización intracelular como IP3, Ras/Erk, AMPK y PLC y dentro del núcleo (Huang y Reichardt, 2001; Sofroniew

et al, 2001; Curtis et al,1995; Patapoutian y Reichardt, 2001; Allsopp et al, 1994; Fariñas y Reichardt, 1996; Huang y Reichardt 2003; Zhang et al, 2000)

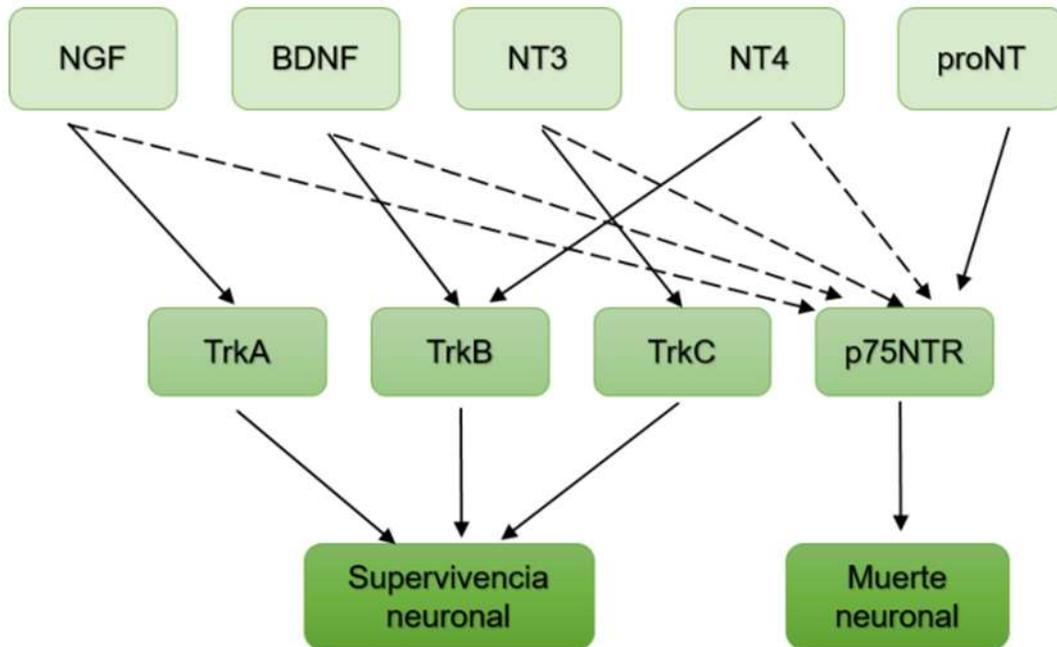


Figura 10. Familia de las neurotrofinas y su interacción con receptores Trk y p75

Al enlazarse a su receptor de alta afinidad, las NTs serán llevadas hasta el soma mediante transporte axonal retrógrado (desde los botones terminales hasta el soma neuronal), donde serán responsables de iniciar diversos efectos promotores de la supervivencia, crecimiento neuronal, plasticidad sináptica, mielinización, diferenciación, mediante la activación de varias vías de señalización intracelular como IP3, Ras/Erk, AMPK y PLC y dentro del núcleo. Esquema basado en Berkemeier et al, 1991; Squinto et al, 1991; Tyler et al, 2002)

1.13 Excitotoxicidad y BDNF

La excitotoxicidad se asocia con otros trastornos del SNC agudos y crónicos (Choi, 1988), lo que agrega relevancia al desarrollo de terapias para mitigar la excitotoxicidad. Un enfoque prometedor es la mejora de las vías de supervivencia, como las reguladas por BDNF a través de la unión a los receptores TrkB. Se ha sugerido que la promoción de la supervivencia neuronal por el BDNF está mediada por la dimerización, el aumento de la actividad de la tirosina cinasa (TK) y la transfosforilación de su receptor de alta afinidad, TrkB de longitud completa (TrkB-

FL). Su activación de TrkB desencadena tres cascadas interconectadas: MAPK/ERK, PI3K/Akt y PLC γ (Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006; Johnson et al, 2007).

Entre otras funciones, se ha visto que estas cascadas de señalización intracelular activan los factores de transcripción prosupervivencia CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc; Bonni et al, 1999) y MEF2 (factor potenciador de miocitos 2; Liu et al, 2003) que regulan la expresión de genes diana, incluidos los que codifican BDNF (Tao et al, 1998; Lyons et al, 2012), TrkB (Deogracias et al, 2004) o subunidades NMDAr (Krainc et al, 1998; Desai et al, 2002; Lau et al, 2004). Hasta la fecha se han demostrado tres mecanismos independientes inducidos por excitotoxicidad que actúan sobre TrkB: (a) una inversión de las proporciones de ARNm desfavorece la expresión de TrkB-FL (asociada a la supervivencia celular) sobre TrkB-T1 (la cual es una isoforma truncada del receptor, que carece de dominio cinasa intracelular y está asociada a la degeneración) (Gomes et al, 2012; Vidaurre et al, 2012); (b) la escisión de TrkB-FL por la calpaina dependiente de Ca²⁺ genera un receptor truncado similar a TrkB-T1, lo que incrementa la pérdida de la supervivencia (Gomes et al, 2012; Vidaurre et al, 2012); y (c) la proteólisis intramembrana regulada (RIP) de ambas isoformas por la acción de la metaloproteínasa / γ -secretasa arroja ectodominios idénticos que actúan como captadores del BDNF (Tejeda et al, 2016).

Tomando en cuenta lo anterior se sabe algunos de los mecanismos por los cuales la excitotoxicidad pudiera estar ejerciendo cambios supervivencia a través de la unión BDNF-TrkB, pero se desconoce si el efecto protector de la SAC es modulado por la regulación de las vías de señalización antioxidante y si parte del proceso de activación de Nrf2 puede estar subordinado por la estimulación de la vía BDNF-TrkB, por lo que este estudio se centra en esclarecerlo.

2. Justificación

Considerando que hasta el momento no se ha logrado establecer una terapia efectiva para detener el deterioro físico y cognitivo de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas, el desarrollo de nuevas terapias resulta de gran importancia. El planteamiento de la administración de antioxidantes exógenos como la “SAC” presenta ventajas ya que previene la generación excesiva de las ERO, evitando así que se produzca el daño celular por efecto del EO (Pérez-Severiano et al, 2004; Pérez-De La Cruz et al, 2008; Elinos-Calderón et al, 2010) “sin embargo” es necesario caracterizar los mecanismos y vías de señalización implicadas por los que este tratamiento podría estar efectuando su papel neuroprotector, por lo que en este estudio se empleará un modelo *in vitro* (rebanadas corticales) que se expondrá a un paradigma excitotóxico con QUIN. Debido a que ERK es una vía susceptible al “EO” (Lander et al, 1996), la finalidad de este trabajo es dilucidar si la “SAC” al desplegar sus propiedades antioxidantes y disminuir el “EO” ejerce cambios en la modulación de esta vía.

3. Hipótesis

En el modelo experimental de toxicidad inducido por QUIN, el pre-condicionamiento con la SAC atenuará los efectos neurotóxicos, inflamatorios y oxidantes inducidos por QUIN, a través de la activación de mecanismos de señalización de la vía Nrf2/Keap1/ARE mediante la modulación de la vía de ERK 1/2.

4. Objetivos

1.1 Objetivo general

Investigar la participación del antioxidante exógeno SAC en la activación de Nrf2, así como su modulación en la vía de señalización ERK1/2.

1.2. Objetivos particulares

- Evaluar el potencial del antioxidante natural derivado del ajo, la S-alilcisteína, administrada tanto previa como posteriormente al QUIN en rebanadas corticales.

- Determinar si el pre-condicionamiento o el post-tratamiento con la SAC modifica la viabilidad mitocondrial, niveles basales de GSH y/o el daño neuronal
- Cuantificar Nrf2 y su unión a su secuencia consenso ARE en los grupos experimentales y verificar si está involucrada con los cambios en la expresión de la enzima HO-1
- Evaluar si existen cambios en expresión/regulación de ERK1/2 en el pre-condicionamiento y post-tratamiento con la SAC.
- Evaluar si los cambios en los niveles $TNF\alpha$ y la preservación de BDNF forman parte de los mecanismos protectores de la SAC.

5. Metodología

5.1. Animales

Se emplearon 10 ratas macho Wistar con un peso entre 270- 320 g. Todos los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($25.8 \pm 3^\circ\text{C}$) e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con suministro de dieta estándar (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feed Inc., Richmond, IN, EEUU) y agua *ad libitum*. Durante los experimentos, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. El estudio realizado fue aprobado por el Comité de Ética (No de oficio 70/15) de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

5.2. Obtención de rebanadas corticales de cerebro de rata

Se sacrificaron 10 ratas machos Wistar por decapitación, posteriormente el cerebro se disecó y se aisló la corteza motora. Se colocó la corteza en papel filtro (humedecido con solución fisiológica de Krebs), previamente montado en el Chopper y se obtuvieron rebanadas con un grosor de 300 μm .

El tejido rebanado se colocó en una caja Petri con que contenía buffer de Krebs (Sacarosa, glucosa, bicarbonato, KCl y MgCl), después se procedió a separar las rebanadas utilizando un microscopio estereoscópico. Se colocó una rebanada por pozo, los cuales contenían 490 μl de solución Krebs. Las rebanadas se dejaron incubando 30 minutos a 37°C .

5.3. Tratamientos de rebanadas corticales

Por protocolo experimental se utilizó una rata Wistar, del cual se obtuvieron en promedio 50 rebanadas del tejido cortical que se distribuyeron entre los 5 grupos experimentales. Después de realizar la pre-incubación de 30 min, se realizaron los siguientes tratamientos:

- Grupo Control (CT): Se incubaron durante 60 min con 500 μ l Solución Krebs, posteriormente se decantó y se incubaron nuevamente con el mismo volumen de solución fisiológica.
- Grupo QUIN (100 μ M): Se incubaron 60 min con 500 μ l de buffer de Krebs pasado dicho periodo, se retiró la solución y se incubó durante el mismo tiempo con 10 μ l de QUIN y 490 μ l de Krebs.
- Grupo SAC (100 μ M): Las rebanadas fueron incubadas con 10 μ l de SAC durante 60 min, después se trataron con 490 μ l de solución Krebs.
- Grupo SAC+QUIN: Se trataron las rebanadas con 10 μ L SAC (100 μ M) y 490 μ l de Krebs durante 60 min, pasado este período se incubaron con QUIN 10 μ l (100 μ M) y 490 μ l de Krebs durante el mismo periodo.
- Grupo QUIN+SAC: Las rebanadas se incubaron con QUIN (100 μ M) y posteriormente con SAC (100 μ M) durante 60 min respectivamente.

5.4. Ensayo de Actividad reductora celular (MTT)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y NADPH en formazan (compuesto que presenta coloración azul), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método se utiliza para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de color es directamente proporcional al número de mitocondrias viables

Una vez realizados los tratamientos anteriormente mencionados, se retiró el sobrenadante y se adicionó 300 μ l de buffer de Krebs + 15 μ l de reactivo MTT (5 mg/ml) y se dejaron incubando durante 60 min a 37°C. Luego de la incubación se eliminó el sobrenadante por completo y se agregó 250 μ l de alcohol ácido (HCl 0.4 N, isopropanol) para extraer el formazan. Se procedió a leer dicho sobrenadante en un espectrofotómetro a 570 nm y las rebanadas fueron pesadas. La actividad reductora metabólica se cuantificó para cada rebanada mediante la obtención de la relación peso/absorbancia.

5.5. Ensayo de peroxidación lipídica

La lipoperoxidación (LPO) es un evento que acompaña la lesión celular, por lo que la detección de sus productos para evaluar el estrés oxidativo es de vital importancia. El método más frecuente para evaluarlo se realiza mediante la estimación de malondialdehído (MDA), el cual es originado en las últimas etapas de la peroxidación lipídica y es una sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell y Chirico, 1993). El fundamento de esta técnica se basa en hacer reaccionar el MDA con TBA en medio ácido, lo que forma un cromógeno rosa, que posteriormente se estima mediante absorbancia. La concentración de MDA estimado es directamente proporcional a la absorbancia.

Terminados los tratamientos de cada grupo, se colocaron las rebanadas en tubo eppendorf y se adicionó 60 μ l de buffer de lisis (NaCl 150 mM, Triton 0.1%, Tris HCl 50 mM, Sacarosa 0.0085gr) y se sonicaron las muestras. Se tomaron 50 μ l de la muestra homogenada y se adicionaron 100 μ l de reactivo TBA (0.375 gr TBA, 15 gr de TCA, 25ml de HCl 1N).

Se pusieron en baño maría las muestras y una vez comenzada la ebullición se dejaron durante 20 min. Pasado el tiempo, se centrifugaron por 15 min a 12,000 r.p.m. Se tomaron 120 μ l del sobrenadante de las muestras y se leyeron a 532 nm en el espectrofotómetro.

Los otros 10 μ l restantes del homogenado se tomaron para cuantificar proteínas mediante el método de Lowry et al, 1951) y se leyeron las muestras a 660 nm. Se estableció la relación para poder cuantificar las TBARS de cada rebanada.

5.6. Ensayo de GSH/GSSG

La determinación de GSH y GSSG se realizó mediante el método de Hissin y Hilf (1976), con ligeras modificaciones. Este método se basa en la capacidad de la sonda de fluorescencia o-ftaldehído (OPA, dicarboxaldehido oftalico) de reaccionar con aminas primarias en presencia de grupos tiol, sulfitos y ciano que generan un compuesto fluorescente (isoindol), detectado a una λ de excitación de 420 nm y 350 nm de emisión. Esta reacción del OPA con el GSH se produce a pH 8 y con GSSG, a pH 12. Un pH superior a 8 provoca la oxidación del GSH, por lo cual se adicionó

N-etilmaleimida (NEM). El contenido total de glutatión de la muestra es determinado por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH y GSSG.

Después de haber realizado los tratamientos, se agregó a las rebanadas 500 μ l de solución Krebs y se almacenó a -70°C . Posteriormente se añadió 4 ml de buffer de fosfatos (fosfato de sodio 0.1M, EDTA 0.005M a pH 8.0) y se sonicó. Se separó 500 μ l para cuantificación de proteínas mediante Lowry. El resto se centrifugó a 12,000 r.p.m durante 10 minutos y se guardó el sobrenadante (muestra) para su posterior análisis. Para cuantificar GSH se realizó únicamente una dilución que consistió en 100 μ l muestra + 1.8 ml Buffer de fosfatos +100 μ l OPA, y se dejó en incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. El GSSG se cuantificó mediante dos diluciones, la primera consistió en añadir 500 μ l de muestra + 200 μ l NEM (0.04M) + 4.3 ml de NaOH (0.1N) y se incubó por 30 minutos.

Se procedió a realizar la segunda dilución agregando 100 μ l de la primera dilución+1.8 ml buffer de fosfatos +100 μ l OPA, y se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias de GSH como GSSG se detectaron a una λ de excitación de 420 nm y 350 nm de emisión. El contenido total de glutatión de la muestra se determinó por la comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. El contenido de glutatión se cuantificó para cada rebanada mediante la obtención de nmol/mg proteína. La cuantificación se expresó como un porcentaje de reducción GSH o aumento de GSSG. La actividad de GSH y GSSG del grupo control se consideró como 100%.

5.7. Ensayo de viabilidad celular por yoduro de propidio

La visualización de una célula con biomoléculas fluorescentes proporciona una amplia información para el análisis de las funciones celulares. Diversas actividades y estructuras de una célula pueden ser objeto de tinción con compuestos fluorescentes; los componentes celulares teñidos más comúnmente son las membranas celulares, proteínas y nucleótidos.

Se utilizó yoduro de propidio (PI) como indicador de viabilidad celular (el cual es un agente intercalante de ADN, que tiene la capacidad de penetrar las membranas de células muertas y/o en proceso apoptótico/necrótico). También se empleó 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) como señalador nuclear (mediante la tinción cromosómica por la interacción de regiones adenina-timina con el ADN). Ambas tinciones fueron sobrepuestas para identificar co-localización. Los resultados se expresaron como porcentaje de células visualizadas por tinción de yoduro de propidio frente al número de células teñidas con DAPI, permitiendo el recuento celular mediante el uso de un microscopio de fluorescencia (Nicoletti et al., 1991; Atale et al., 2014).

Terminados los tratamientos, se enjuagaron las rebanadas corticales con solución PBS 1X (100ml de solución madre, 700 ml de agua destilada, se ajustó pH 7.4 y se llevó a un volumen final de 1000 ml con agua) 0.1% Tween 20. Para realizar el proceso de fijación se utilizó paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las rebanadas posteriormente se lavaron tres veces con PBS frío. Para llevar a cabo la recuperación de antígeno se precalentó el tampón de recuperación de antígeno (Tris 100 mM, 5% [p / v] urea, pH 9.5) a 95 ° C., después se colocaron los cubreobjetos en esta solución y se calentaron a dicha temperatura por 10 min. Posteriormente, se retiraron los cubreobjetos del buffer y se sumergieron en PBS. Se lavaron las rebanadas en PBS tres veces más por 5 minutos.

La permeabilización se llevó a cabo mediante la incubación de las muestras durante 10 minutos con PBS que contenía Tritón X-100 (PBST). Al finalizar se lavaron las células con PBS tres veces durante 5 min. Posteriormente las rebanadas se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 30 minutos para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos. Después se incubaron las rebanadas con el anticuerpo diluido en BSA al 1% en PBST, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se decantó la solución y nuevamente se lavaron las rebanadas con PBS. Se procedió a incubar las células con el anticuerpo secundario en BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente (oscuridad), se desechó la solución de anticuerpo secundario y se lavaron tres veces con PBS. Para finalizar se incubó las

muestras en 0,1-1 µg / ml de DAPI (tinción de ADN) durante 1 minuto y se enjuagó con PBS. El montaje se realizó sobre el cubreobjetos con una gota de medio de montaje y se selló con un cubreobjetos (con esmalte de uñas para evitar desecación). La relación PI / DAPI en todos los tratamientos, se calculó sobre la base de los píxeles cuantificados por imagen.

5.8. Aislamiento de fracciones citosólicas y nucleares.

Los cortes corticales se almacenaron a -70°C. En el momento del uso, las rodajas se molieron en polvo en un mortero congelado, utilizando nitrógeno líquido. Una vez que el tejido se pulverizó, se obtuvieron fracciones nucleares con el kit NE-PER (Thermo Scientific, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, suplementado con un inhibidor de la proteasa (Mini cóctel inhibidor de la proteasa, Roche, Alemania, MA) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.9. Ensayo de unión a Nrf2 / ARE

La actividad de Nrf2 se determinó con el ensayo TransAm Nrf2 (Active Motif, Carlsbad, CA), según un informe anterior (Silva-Palacios et al., 2019). Los extractos nucleares (10 µg, no se realizó ajuste por proteína) se incubaron con oligonucleótidos inmovilizados que contenían el sitio de unión de la secuencia consenso ARE (5'GTCACAGTGA CT CAGCAGAATCTG-3') en placas de 96 pocillos. La forma activa de Nrf2 que unía el oligo se detectó usando un anticuerpo primario Nrf2 después de tratar con anticuerpo secundario conjugado con HRP. La lectura de la actividad depende de la unión de los extractos nucleares a la secuencia ARE (que está embebida en el pozo de la placa) y de la formación del complejo colorido (Ac 1^o-Ac 2^o acoplado a HRP y TMB). Para analizar esta unión, se midió la absorbancia a una densidad óptica de 450 nm, usando un lector de placas multimodem Synergy (BioTek, Winooski, VT). Se graficó la absorbancia obtenida en el ensayo y se reportó como actividad de unión Nrf2/ARE (O. D. 450 nm).

5.10. Análisis de inmunotransferencia

El Western Blot es una técnica compleja de biología molecular que se utiliza para determinar la cantidad de una proteína en una muestra problema. Las técnicas que se emplean son la electroforesis, la electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa y la detección de la proteína deseada por inmunoquimioluminiscencia. La proteína (30-50 µg) de cada muestra se diluyó 1:1 con tampón de muestra de concentrado Laemmli 2X (Sigma Aldrich, San Luis, MO) y se desnaturalizó por ebullición durante 5 minutos. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: anti-fosfo-ERK1 / 2 (# 4376, 1:1000) y anti-ERK1 / 2 (# 9102, 1:1000) de Cell Signaling, Danvers, MA., anti-HO-1 (# 3391, 1:2000) de BioVision, Milpitas, CA., y anti- α -Tubulina (T9026, 1:10,000) de Sigma-Aldrich, San Luis, MO. La relación entre la proteína fosforilada y la proteína total se obtuvo usando la misma membrana. Se usaron anti- α -tubulina como control de carga para la proteína citosólica. El análisis densitométrico se realizó utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

5.11. ELISA de TNF α y BDNF

Los niveles de TNF α y BDNF se midieron en el tejido cerebral usando el ensayo de inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA) DuoSet ELISA kit Rat TNF α Dy510-05 (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU., MN) Y el kit DuoSet ELISA Human / Mouse BDNF Dy248 con mouse- reacción cruzada del epítipo de rata (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU. MN), respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor. Los cortes cerebrales ponderados se recuperaron y se homogeneizaron mediante sonicación usando 300 µl de solución tampón de lisis (Tris 20 mM, sacarosa 0.25 M, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM, TritonX-100 1%) que contiene un cóctel inhibidor de proteasa. Las muestras se incubaron en una placa recubierta con anticuerpo de captura durante 24 h a 4 ° C con PBS-Tween 20 (0,05%) / BSA al 0,5%, se lavaron tres veces y se incubaron con anticuerpo de detección durante 2 h a temperatura ambiente.

El sistema de antígeno-anticuerpo unido se detectó usando sustrato 5,5 tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, EE. UU., MO). Las lecturas de densidad

óptica se realizaron a 450 nm y 570 nm. El valor corregido se calculó como $A_{450\text{ nm}} - A_{570\text{ nm}}$. Ambos ensayos se realizaron por duplicado y sus sensibilidades fueron de 15,63 pg/ml para ambos, TNF α y BDNF. Los resultados de la muestra se ajustaron a pg/mg de tejido usando el peso de los tejidos y el factor de dilución.

5.12. Análisis estadístico

Los datos son promedios \pm SEM de al menos 7 (rebanadas) experimentos independientes en cada grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, usando el software Prims 6.0 (GraphPad, San Diego, EE. UU., C.A), Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. Resultados

6.1. La administración de SAC preserva la actividad reductora/viabilidad celular alterada por el QUIN en rebanadas corticales

La capacidad reductora mitocondrial / viabilidad celular se estimó mediante el ensayo de reducción MTT. La Figura 11 muestra la disminución de la capacidad reductora inducida por QUIN en comparación con el control (61%; $p < 0.01$). También se observa que en cortes pre-condicionados con SAC, la pérdida de viabilidad celular no difirió del control, pero sí aumento de manera significativa respecto al grupo de QUIN (18% por arriba del control, 211% por arriba de QUIN; $p < 0.01$ en comparación con QUIN). Las muestras de tejido expuestas por primera vez a QUIN y luego tratadas con SAC mostraron una preservación parcial de la actividad mitocondrial en respuesta a QUIN (85% por arriba de QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). La SAC sola no modificó la capacidad reductora mitocondrial basal.

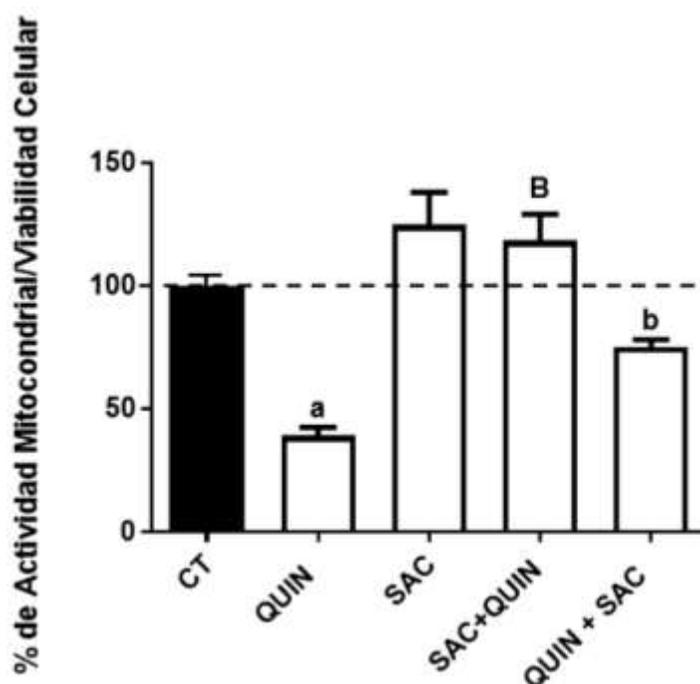


Figura 11. Efecto de la SAC sobre las alteraciones en la actividad metabólica reductora celular inducida por el QUIN en rebanadas corticales de rata. Las rebanadas fueron tratadas con QUIN (100 μ M) y/o SAC (100 μ M). Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 10$ rebanadas por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.005$, ^B $p < 0.0001$ diferente del grupo QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.2. SAC previene la peroxidación lipídica inducida por QUIN en rebanadas corticales

El daño oxidativo a los lípidos, evaluado como los niveles de formación de TBA-RS (Figura 12), aumentó significativamente por QUIN en comparación con el control (67%; $p < 0.01$). Los niveles de este marcador se atenuaron por completo en cortes expuestos a QUIN pre-condicionados con SAC (1% por debajo del control, 41% por debajo de QUIN; $p < 0.01$ en comparación con QUIN), pero solo parcialmente recuperados en los cortes expuestos primero a QUIN y luego tratados con SAC (18% por arriba del control, 28% por debajo de QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). La SAC sola disminuyó la peroxidación lipídica basal un 43%.

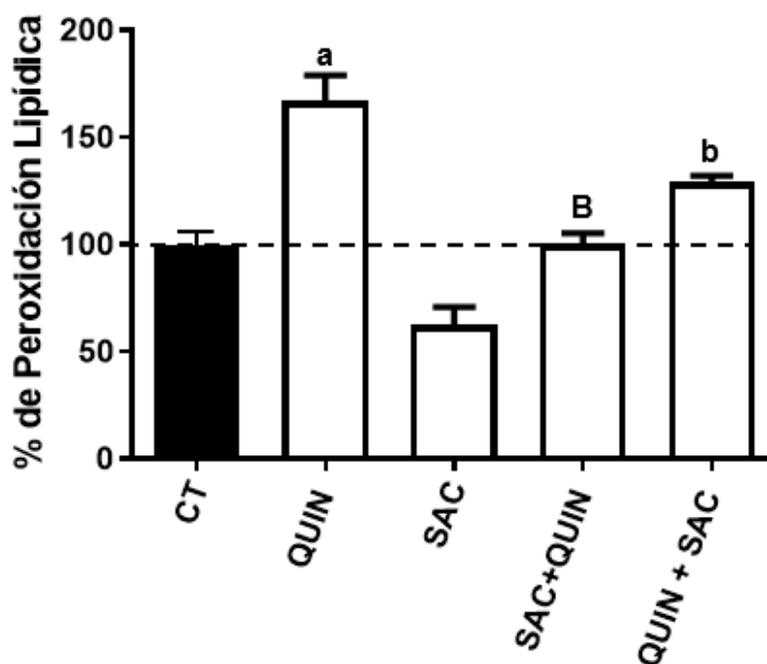


Figura 12. Efecto de la SAC sobre la peroxidación lipídica inducida por el QUIN (100 μ M) en rebanadas corticales de rata (100 μ M). Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 10$ rebanadas por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.005$, ^B $p < 0.0001$ diferente de QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.3. La SAC mejoró los niveles de glutatión modificados por el QUIN

La Figura 13 representa el efecto de SAC sobre los cambios inducidos por QUIN en los niveles de GSH, GSSG y la relación GSH / GSSG. En el panel (A), se observa que el QUIN disminuyó los niveles basales de GSH en un 32% ($p < 0.05$ en comparación con el control), mientras que las rebanadas pre-condicionadas con SAC mostraron una recuperación completa en los niveles de GSH y son estadísticamente indistinguibles de los controles (25% por arriba del control, 84% por arriba de QUIN; $p < 0.01$ en comparación con QUIN). Cuando se expusieron por primera vez a QUIN y se trataron posteriormente con SAC, las muestras de tejido mostraron niveles de GSH análogos al control (6% por debajo del control, 30% por arriba de QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). La SAC sola aumentó los niveles basales de GSH en un 48% ($p < 0.05$ en comparación con el control). En (B), QUIN aumentó los niveles basales de GSSG en un 38% ($p < 0.05$ en comparación con el control), mientras que el pre-condicionamiento de SAC en cortes expuestos a QUIN mostró valores de GSSG por debajo del QUIN (19% por debajo del control, 42% debajo de QUIN; $p < 0.01$). La administración de SAC después de la exposición a QUIN produjo una disminución parcial en GSSG en comparación con el tratamiento con el grupo de QUIN (13% por arriba del control, 19% por debajo de QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). La SAC sola disminuyó los niveles basales de GSSG en un 58% ($p < 0.05$ en comparación con el control). En el panel (C), la relación GSH/GSSG confirma los resultados descritos en (A) y (B); mientras que QUIN redujo esta proporción en un 60% ($p < 0.05$ en comparación con el control), el pre-condicionamiento con SAC mejoró este equilibrio en un 23% por arriba del control (202% por arriba de QUIN; $p < 0.01$ en comparación con QUIN) y post-tratamiento con la SAC no mostró diferencias con respecto al tratamiento de QUIN (18% por arriba de QUIN). La SAC sola aumentó el valor basal de esta relación en un 166% ($p < 0.05$ en comparación con el control).

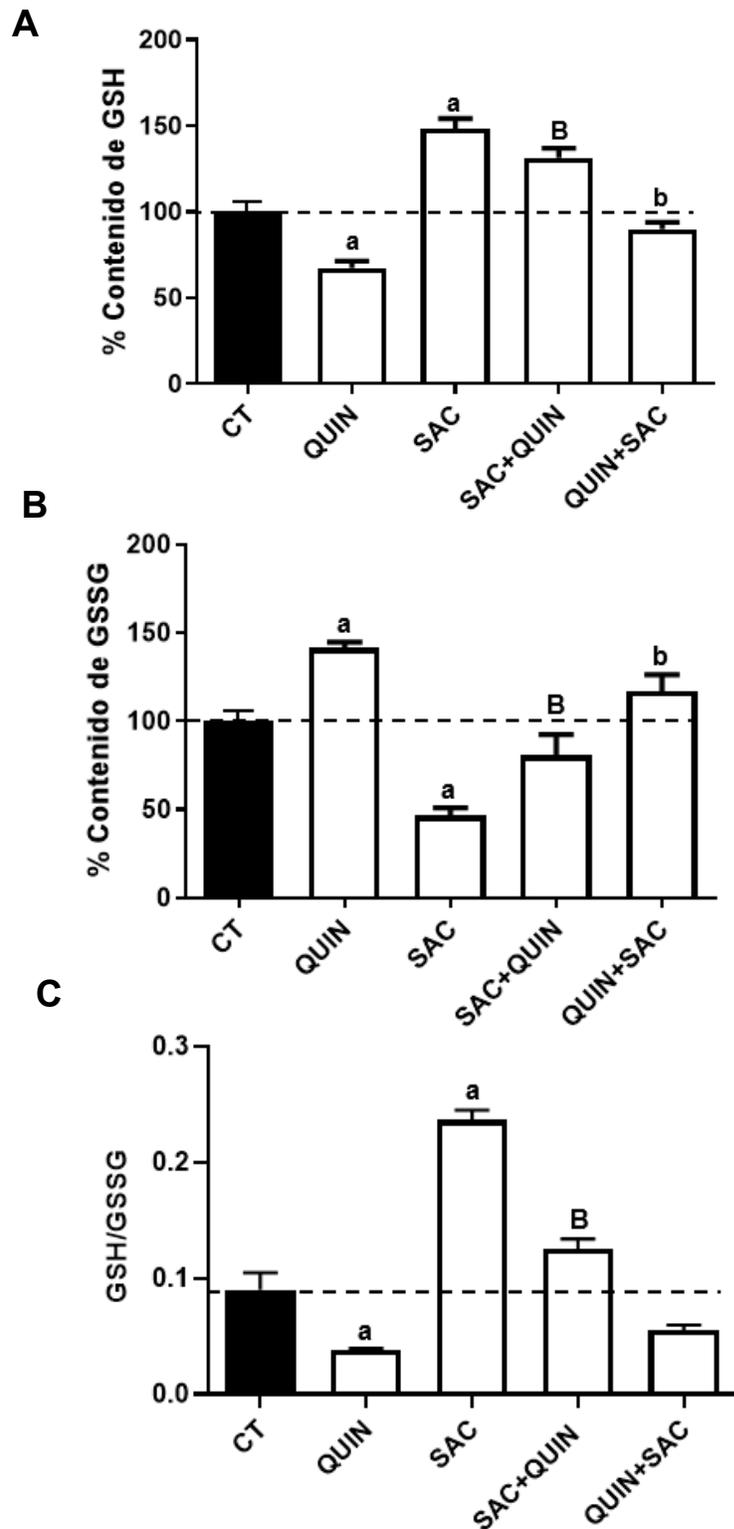
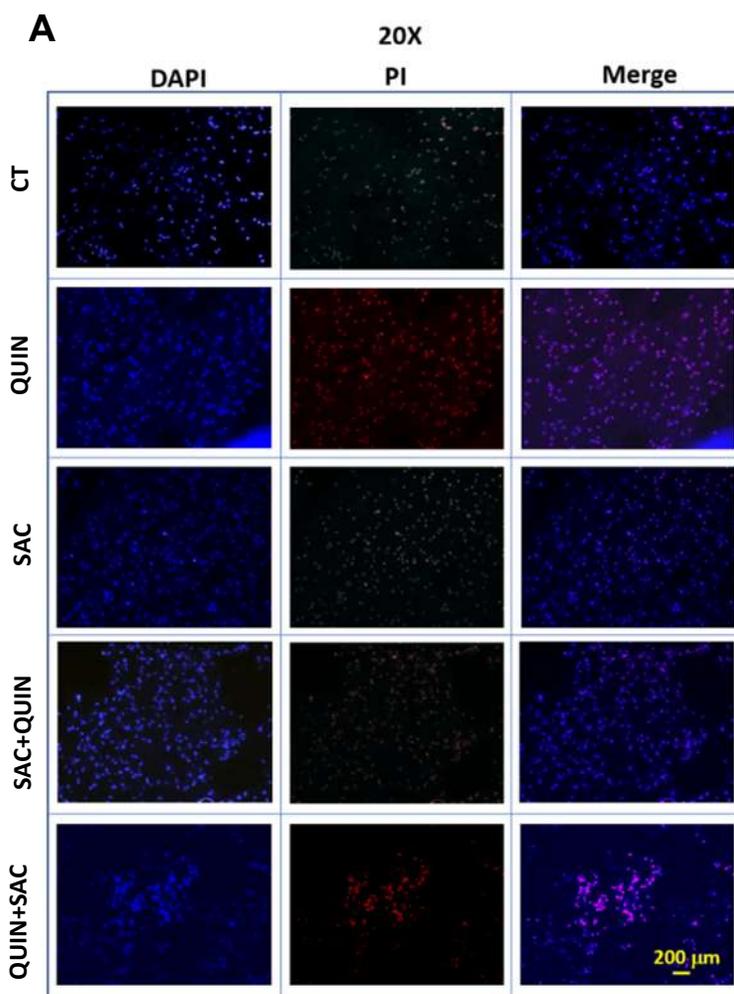


Figura 13. Efecto de la SAC (100 μ M) sobre los niveles tisulares de GSH (A), GSSG (B), y el balance GSH/GSSG (C) alterados por el QUIN (100 μ M) en rebanadas corticales de cerebro de rata. Cada barra representa el promedio + S.E.M. de n = 10 rebanadas por grupo (conformando un total de 50 rebanadas para el análisis de este protocolo experimental). ^ap<0.0001, diferente del control; ^bp<0.005, ^Bp<0.0001 diferente del grupo QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.4. El tratamiento con SAC redujo el daño celular inducido por QUIN

La Figura 14 representa el efecto de la SAC sobre el daño celular inducido por QUIN. En el panel (A), el aumento de 20x muestra una vista general de las rebanadas expuestas a PI después de realizar los tratamientos con QUIN, SAC, SAC + QUIN o QUIN + SAC, que representan la amplia población de células en la muestra de tejido cortical que produce tinción positiva para PI en el tratamiento con QUIN, que contrasta con una tinción moderada en el pre-condicionamiento con SAC, y una tinción parcial en el tratamiento con QUIN más SAC. Los detalles de los núcleos teñidos con DAPI y las células positivas para PI para cada tratamiento se presentan en el panel (B) (aumento de 100x), donde especialmente en el tratamiento QUIN, la tinción de PI y DAPI se co-localiza (fusiona) en varias células. En el panel inferior, el gráfico muestra la relación PI / DAPI en todos los tratamientos, que se calculó sobre la base de los píxeles cuantificados por imagen. Se puede observar que el QUIN mejoró la proporción inicial en un 170% ($p < 0.05$ en comparación con el control), mientras que el pre-condicionamiento con SAC redujo el efecto de QUIN en un 32 % (83 % por arriba del control; $p < 0.01$ en comparación con QUIN) El tratamiento QUIN y la posterior administración de SAC disminuyó ligeramente el efecto de QUIN en un 8 % (150 % por arriba del control; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). SAC solo no cambio la relación PI /DAPI de manera significativa en comparación con el control.



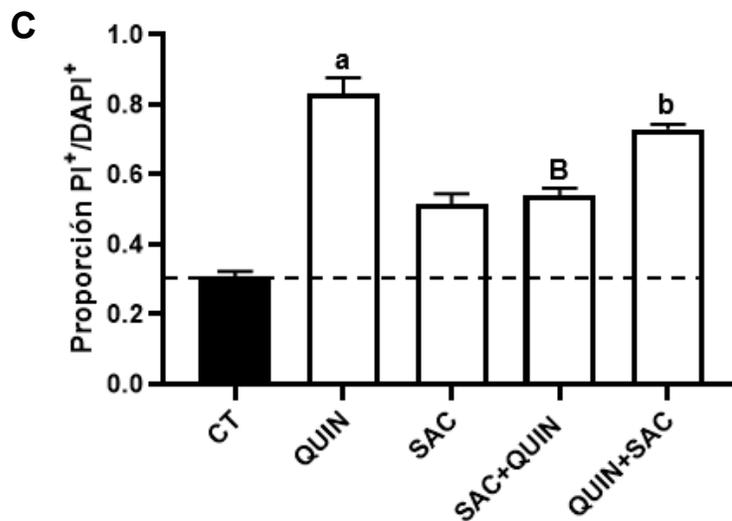
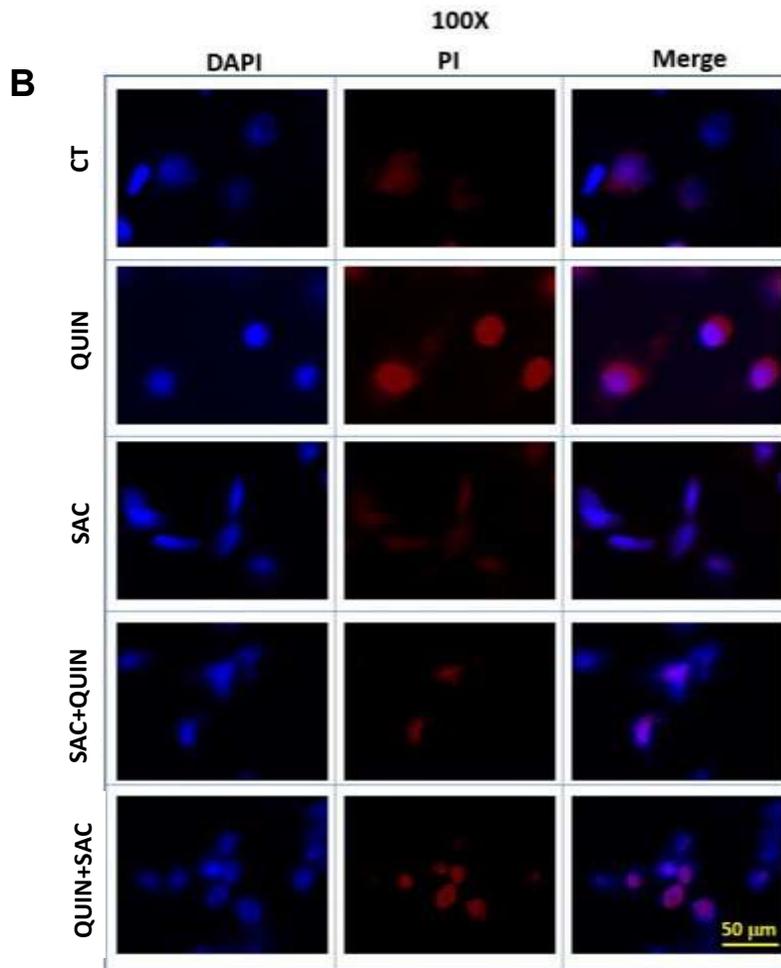


Figura 14. (A,B). Inmunofluorescencia contra IP (rojo) y DAPI (azul) en rebanadas corticales de rata expuestas a los diferentes tratamientos (20x y 100x, respectivamente). En **C**, representación gráfica de los conteos de células inmunopositivas. Las rebanadas fueron tratadas con QUIN (100 μ M) y/o SAC (100 μ M). Cada barra representa el promedio + S.E.M. de n = 10 rebanadas por grupo. ^ap<0.0001, diferente del control; ^bp<0.005, ^Bp<0.0001 diferente del QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.5. La SAC recuperó la actividad de unión a Nrf2 / ARE cuya disminución fue inducida por QUIN

Para saber si la regulación positiva y la activación de Nrf2 están involucradas en los efectos protectores tempranos de SAC sobre los eventos excitotóxicos, la actividad de unión a Nrf2 /ARE se midió como un índice del estado funcional de Nrf2. En la Figura 15, se puede observar que el QUIN disminuyó este parámetro en un 25 % en comparación con el control ($p < 0.01$), mientras que el pre-condicionamiento con SAC condujo a la recuperación de los niveles basales mostrando un incremento respecto al QUIN (4 % por arriba del control, 44 % por arriba del tratamiento con QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). El tratamiento QUIN más SAC también condujo a la recuperación de los niveles de actividad de unión a Nrf2/ARE hasta niveles basales (0.5 % por arriba del control, 42 % por arriba del tratamiento con QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). Por otro lado, SAC no modificó los niveles de referencia de este marcador (9 % por arriba del control)

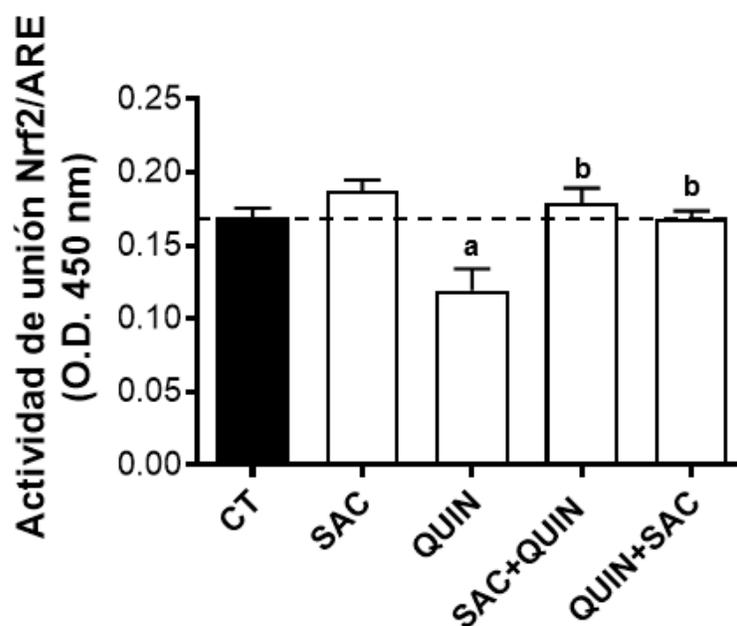


Figura 15. Efecto de la S-alilcisteina (100 μ M) sobre la actividad Nrf2/ARE alterada por ácido quinolínico (100 μ M) en rebanadas corticales de rata incubadas por 60 minutos con ambos agentes. Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 6$ experimentos por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.0001$, diferente de QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.6. La SAC previno la disminución en los niveles de la proteína HO-1 inducido por QUIN

Los niveles de proteína HO-1 se estimaron como un índice funcional de la activación del eje Nrf2-ARE (Figura 16). En el panel izquierdo, una inmunotransferencia representa las bandas de HO-1 de todos los tratamientos, donde la densidad de esta proteína se reduce claramente en el tratamiento con QUIN y se conserva en otras condiciones. Según estas observaciones, la densidad de las bandas medidas por análisis densitométrico (panel derecho) reveló que el QUIN redujo los niveles basales de HO-1 en un 40 % ($p < 0.01$), mientras que el pre-condicionamiento con SAC previno este efecto inducido por el QUIN (2% por arriba del control, 43 % por arriba de QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). Por otro lado, el post-tratamiento con SAC condujo a la recuperación parcial de los niveles de proteína en comparación con el tratamiento con el QUIN (20 % por debajo del control, 33 % por arriba de QUIN; N.S.). La SAC no modificó los niveles basales de HO-1 (5 % sobre el control).

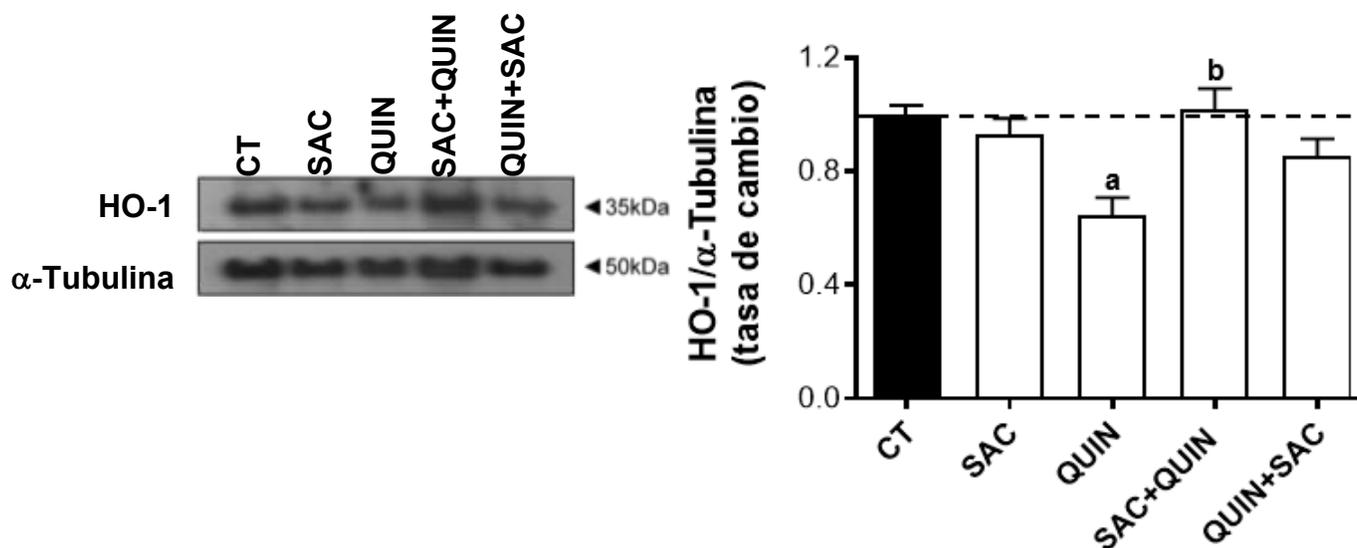


Figura 16. Efecto de la SAC (100 μ M) sobre los niveles tisulares de HO-1 alterados por el QUIN (100 μ M) en rebanadas corticales de rata incubadas por 60 minutos con ambos agentes. Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 6$ experimentos por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.0001$, diferente del grupo QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.7. La disminución en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por QUIN fue parcialmente evitada por SAC

La Figura 17 representa los niveles de proteína de la fosforilación de ERK 1/2 como un índice de activación de la señalización de ERK 1/2. En el panel izquierdo, se muestran bandas de inmunotransferencia de ERK 1/2 fosforilada y ERK 1/2 total de todos los tratamientos, donde la mayoría de las condiciones exhiben niveles disminuidos de la forma fosforilada en comparación con el control. En el panel derecho, el análisis densitométrico confirma que QUIN disminuyó la relación pERK1/2/tRK1/2 basal en un 36% ($p < 0.05$ en comparación con el control), mientras que el pre-condicionamiento con SAC previno parcialmente este efecto (20% debajo del control, 23% por arriba del tratamiento con QUIN; $p < 0.05$ en comparación con QUIN). El post-tratamiento con SAC no modificó el efecto de QUIN solo (35% por debajo del control). Curiosamente SAC solo también redujo la proporción basal de pERK1/2/tRK1/2 de manera significativa (45% por debajo del control; $p < 0.05$).

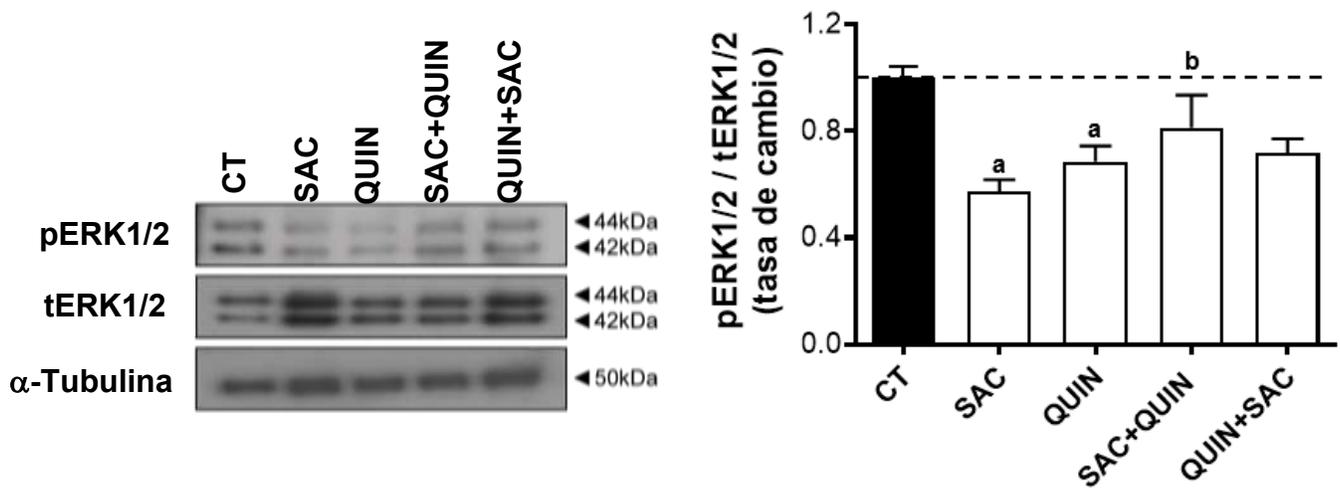


Figura 17. Efecto de la S-alilcisteína (100 μ M) sobre los niveles de fosforilación de ERK 1/2 alterados por ácido quinolínico (100 μ M) en rebanadas corticales de rata incubadas por 60 minutos con ambos agentes. Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 6$ experimentos por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.0001$, diferente del grupo QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.8. La SAC disminuyó la disminución de BDNF inducido por QUIN.

Se estimaron los niveles de BDNF para investigar si los efectos protectores de la SAC implican la conservación temprana de la neurotrofina endógena BDNF en el modelo excitotóxico (Figura 18). El QUIN redujo los niveles basales de BDNF en un 84 % ($p < 0.001$), mientras que el pre-condicionamiento con SAC previno parcialmente este efecto (30 % por debajo del control, 329 % por arriba del tratamiento con el QUIN; $p < 0.01$ en comparación con el QUIN). El post-tratamiento con la SAC no modificó el efecto tóxico del QUIN (25 % por debajo del tratamiento con QUIN). La SAC sola no alteró los niveles basales de BDNF (5 % por arriba del control).

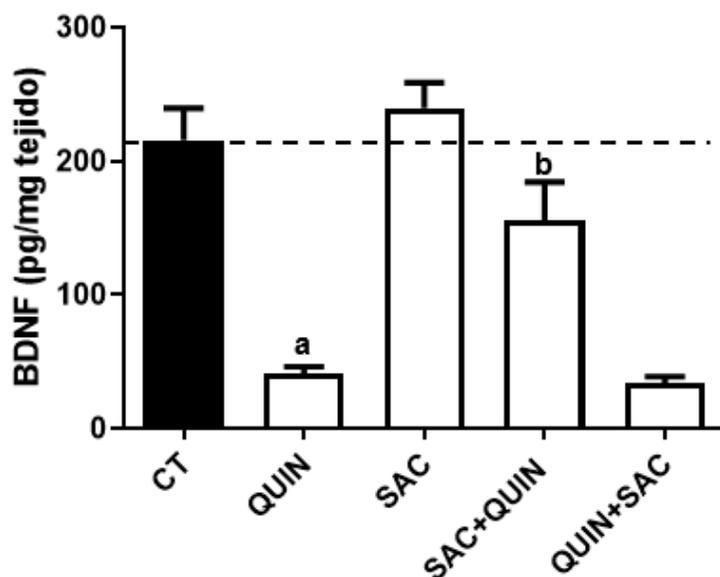


Figura 18. Efecto de la S-alilcisteína (100 μ M) sobre los niveles tisulares de BDNF disminuidos por ácido quinolínico (100 μ M) en rebanadas corticales de rata incubadas por 60 minutos con ambos agentes. Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 8$ experimentos por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.0001$, diferente del grupo QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

6.9. La SAC previno el aumento inducido por el QUIN en los niveles de TNF- α

Para saber si los efectos protectores ejercidos por la SAC sobre la toxicidad inducida por el QUIN implicaban la regulación de señales inflamatorias tempranas, se realizaron experimentos adicionales para cuantificar los niveles del factor proinflamatorio TNF- α (Figura 19). El QUIN aumentó los niveles basales de este factor en un 103 % ($p < 0.01$), mientras que el tratamiento SAC más QUIN previno completamente este efecto (7 % por debajo del control, 73 % por debajo del tratamiento con QUIN; $p < 0.01$ en comparación con QUIN). El tratamiento QUIN y posteriormente con SAC no modificó el efecto tóxico de QUIN (86 % por arriba del control, 9% por debajo del tratamiento con QUIN; $p < 0,01$ en comparación con el control). La SAC sola no modificó los niveles basales de TNF- α (5 % por debajo del control).

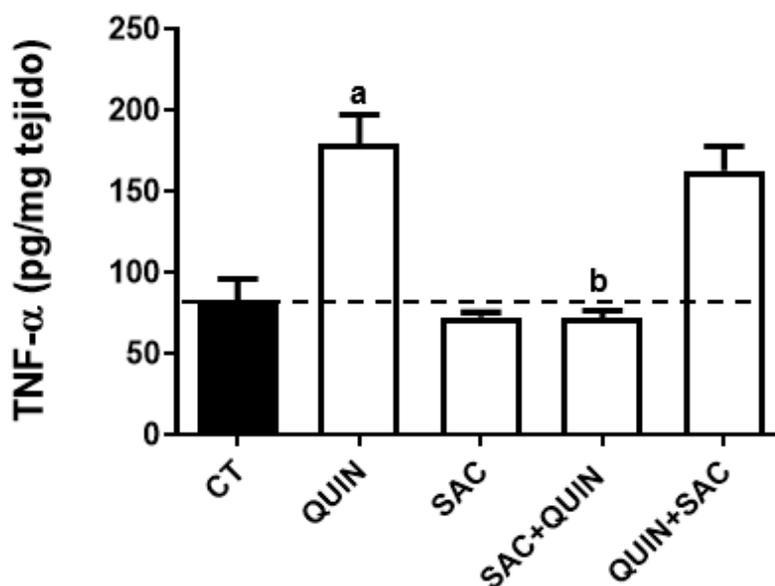


Figura 19. Efecto de la S-alilcisteína (100 μ M) sobre los niveles tisulares de TNF α incrementados por ácido quinolínico (100 μ M) en rebanadas corticales de rata incubadas por 60 minutos con ambos agentes. Cada barra representa el promedio + S.E.M. de $n = 8$ experimentos por grupo. ^a $p < 0.0001$, diferente del control; ^b $p < 0.0001$, diferente del grupo QUIN; ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni.

7. Discusión

En este trabajo por primera vez, fueron evaluados los efectos y los mecanismos que ejerce la SAC sobre varios marcadores de neurotoxicidad aguda en un modelo de daño excitotóxico. La mayor contribución de este estudio radica en la demostración tanto de los mecanismos dañinos como de protección, y los eventos de señalización que ocurren en condiciones tóxicas agudas, lo que valida el uso de modelos simples para explorar respuestas tóxicas y neuroprotectoras. A este respecto, se pueden generar tres conclusiones principales a partir de los hallazgos de este estudio: 1) la SAC es un antioxidante eficaz que también ejerce efectos neuroprotectores sobre los eventos tóxicos tempranos inducidos por el QUIN en el tejido cortical; 2) dicha neuroprotección se caracteriza por una amplia gama de mediadores, que incluyen una actividad antioxidante directa, la regulación positiva del eje Nrf2/ARE con la subsecuente señalización cascada abajo para la regulación positiva de las enzimas de fase II y la conservación de moléculas endógenas con propiedades protectoras como el BDNF y GSH; y 3) el pre-condicionamiento de rebanadas con la SAC fue más eficaz para mitigar el efecto tóxico del QUIN que el post-tratamiento. Los efectos protectores de la SAC pueden estar asociados con su capacidad para inducir respuestas antioxidantes directas y para regular al alza la transactivación nuclear del Nrf2. El tratamiento con la SAC también aumentó los niveles de fosfo-ERK 1/2 y la neurotrofina BDNF antes de que se administrara el QUIN, lo que sugiere que un mecanismo por el cual la SAC aumentó la actividad de unión de Nrf2/ARE implica la modulación previa de BDNF y la activación de la señalización de ERK 1/2. Esta consideración corrobora hallazgos previos que demuestran que la administración de antioxidantes como el resveratrol y la curcumina, aumentan la actividad de fosfo-ERK 1/2 para activar Nrf2, promoviendo la transcripción de genes con respuesta antioxidante y contrarrestando agresiones oxidativas y excitotóxicas (Chen et al, 2005; Santana-Martínez et al, 2019). En apoyo a este concepto, existe evidencia que indica que la transactivación de Nrf2 puede ser estimulada por la vía de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK)/ERK (Xu et al, 2006), induciendo la fosforilación de este factor como resultado de la interacción de BDNF con su receptor TrkB (Deb et al, 2001), lo que sugiere que BDNF regula la vía

MAPK/ERK a favor de la activación de Nrf2 (Bucolo et al, 2019; Chen et al, 2017; Santana-Martínez et al, 2019). De acuerdo a la evidencia descrita anteriormente y a nuestros hallazgos, la disminución en los niveles de BDNF inducida por QUIN, y su preservación por la SAC, sugieren que esta neurotrofina es un objetivo primario temprano para intentar reducir eventos excitotóxicos y estimular respuestas neuroprotectoras. En este contexto, es factible considerar que el QUIN puede reducir la fosforilación de ERK 1/2 a través de la disminución de los niveles de BDNF, inhibiendo así la activación de Nrf2/ARE y reduciendo la respuesta homeostática, lo que conduce a un aumento del daño oxidativo e inflamatorio.

Por el contrario, el pre-condicionamiento (y en menor medida, el post-tratamiento) con SAC mostró una respuesta protectora temprana integral que comprende el aumento de los niveles de GSH, la preservación de BDNF y la estimulación de la actividad de unión de Nrf2/ARE, con la posterior activación de señales antioxidantes como la (HO-1). Al respecto, varios reportes indican que la vía Nrf2/ARE es responsable de la formación de GSH ya que regula la expresión de enzimas como la gamma-glutamato-cisteína ligasa (GCL) (Cruz-Alvarez et al, 2017). Es de destacar que a la SAC se le ha conferido la capacidad de activar la vía Nrf2/ARE (Rodrigues y Percival, 2019) y prevenir la oxidación del GSH ya sintetizado, como sugieren los hallazgos de este estudio.

Se sabe que la vía Nrf2/ARE es responsable de la expresión regulada de varios genes citoprotectores, incluidos genes antioxidantes, genes para enzimas involucradas en la síntesis y regeneración de GSH y genes para la síntesis de moléculas desintoxicantes. Uno de estos genes regulados por la transactivación de Nrf2 es la HO-1 (Alam et al, 1999). Junto con sus productos, la HO-1 ejerce efectos benéficos a través de la activación de mecanismos protectores contra las ERO, la inflamación y la apoptosis (Gozzelino et al, 2010). Nuestros resultados sugieren que la SAC puede inducir la regulación temprana del gen HO-1 a través de la activación de la unión de Nrf2/ARE, y este resultado concuerda con reportes anteriores que muestran que la administración aguda de la SAC aumenta los niveles de HO-1 (Jong et al, 2014).

En este punto, derivado de nuestros hallazgos, surge la siguiente pregunta: ¿cómo se pueden explicar comparativa y mecanísticamente los patrones de expresión de Nrf2 y HO-1 entre los grupos tratados con la toxina vs. la toxina más el post-tratamiento con SAC? Las diferencias conceptuales se pueden atribuir al hecho de que, en contraste con la segunda condición, la excitotoxicidad inducida por el QUIN si ejerció un efecto sobre TrkB, probablemente mediante la escisión de TrkB-FL por una calpaina dependiente de Ca^{2+} , lo que generaría un receptor truncado similar a TrkB-T1, pero sin actividad cinasa, como se ha reportado en otros procesos excitotóxicos (Gomes et al, 2012; Vidaurre et al, 2012). Esto a su vez disminuiría su capacidad de activación de la señalización ERK 1/2, y con ello la actividad de unión Nrf2/ARE, generando así la disminución en la expresión de enzimas como la HO-1. Sin embargo, es importante realizar más estudios para caracterizar mejor la interacción de QUIN con este receptor.

Por otro lado, se sabe que tanto la administración de antioxidantes como la transcripción de genes regulados por Nrf2, tales como la HO-1, la NADPH deshidrogenasa [quinona 1] (NQO-1) y GCL, pueden inhibir la liberación de TNF- α , interleucina-6 (IL-6) y otros mediadores pro-inflamatorios (Reyes-Gordillo et al, 2007; Thimmulappa et al, 2006). Los resultados obtenidos concuerdan con estas observaciones, ya que SAC indujo la unión de Nrf2/ARE, lo que provocó un aumento de las respuestas antioxidantes y la consiguiente disminución de los niveles de TNF- α . Nuestros resultados también sugieren que el pre-condicionamiento del tejido cortical con la SAC facilita una modulación eficiente de los eventos inflamatorios a través de la regulación positiva temprana de la transactivación del Nrf2.

También encontramos que el daño celular inducido por el QUIN se mitiga eficazmente mediante el pre-condicionamiento con la SAC de una manera más eficaz que el post-tratamiento, lo que sugiere que el antioxidante dota al tejido nervioso de recursos protectores para resistir el daño tóxico, preservando la función (mitocondrial), lo cual refleja su capacidad reductora/viabilidad celular y su estado estructural (mediante la preservación de la membrana). Con respecto al ensayo de reducción de MTT, se ha demostrado que la mayor parte de este proceso depende de NADPH y tiene lugar fuera de la membrana interna mitocondrial (Berridge y Tan,

1993); por lo tanto, este método detecta los niveles de NADPH disponibles para la reducción de MTT en células viables.

La preservación de NADPH metabólicamente activo explica varios eventos fisiológicos, incluida la reducción de GSSG a GSH, entre otros (Riss et al, 2013), por lo que, la preservación de la capacidad reductora por la SAC en el modelo tóxico inducido por el QUIN en este estudio refleja no solo la protección de las células funcionales desde etapas tempranas de toxicidad, sino también la participación activa de la capacidad antioxidante/reductora relacionada con NADPH como parte del patrón protector ejercido por la SAC.

Este efecto también está relacionado con la capacidad antioxidante directa reportada para la SAC y sus propiedades antiperoxidativas. Se ha demostrado que la SAC reduce la peroxidación de lípidos de la membrana tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Elinos-Calderón et al, 2010; García et al, 2014; Numagami y Ohnishi, 2001), y esta propiedad se ha atribuido a su potente capacidad como atrapador de radicales libres (Numagami y Ohnishi, 2001). Nuestros resultados apoyan estas observaciones ya que SAC fue eficaz en la prevención del daño oxidativo a los lípidos en el tejido cortical expuesto a QUIN.

En conjunto, la evidencia recopilada en este estudio sugiere que el efecto protector temprano ejercido por la SAC sobre la toxicidad del QUIN está asociado con su capacidad para: 1) inducir respuestas antioxidantes directas y mantener los niveles de GSH, 2) preservar los niveles de BDNF y estimular la regulación positiva de ERK 1/2, 3) activar la unión de Nrf2/ARE y con ello la transcripción de genes antioxidantes, y 4) prevenir la disfunción mitocondrial, la inflamación y el daño celular. Finalmente, en la Figura 20 se muestra una representación esquemática de la serie de eventos involucrados en los efectos protectores que ejerce la SAC sobre los eventos tóxicos tempranos provocados por el QUIN en el tejido cortical, combinados con su descripción detallada.

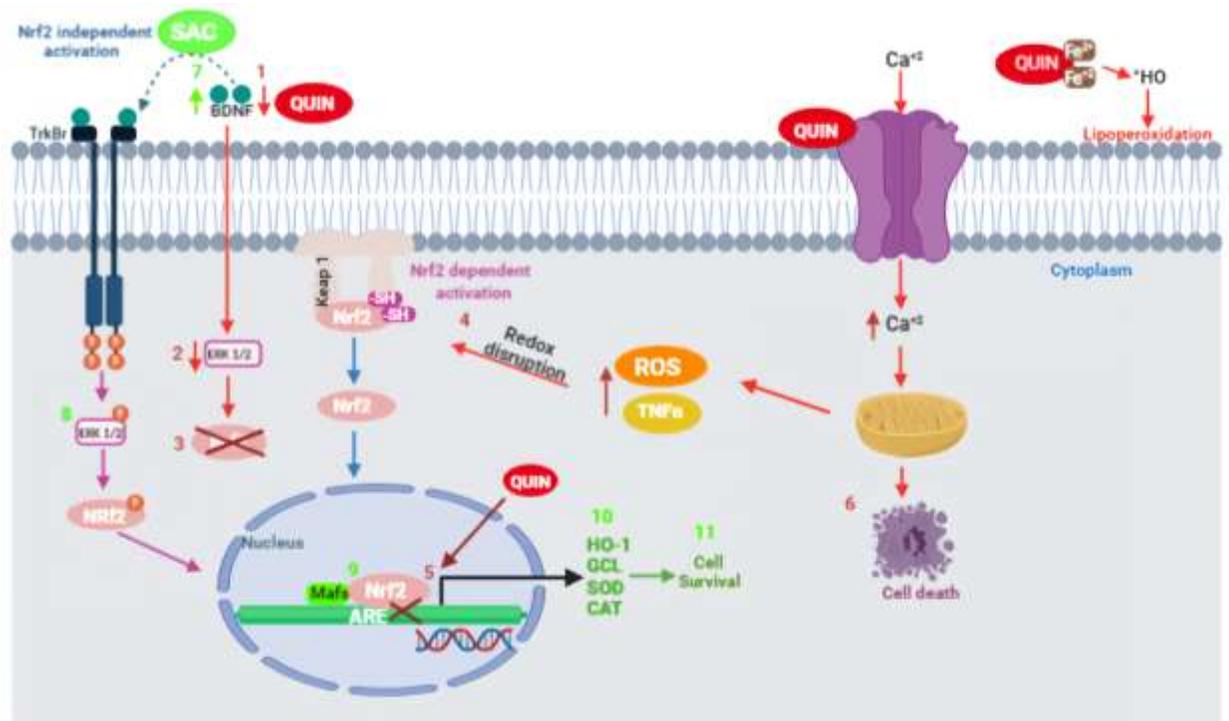


Figura 20. Representación esquemática de los mecanismos de protección involucrados en la regulación de Nrf2 por la S-alilcisteína (SAC) en la corteza cerebral contra el daño inducido por ácido quinolínico (QUIN). La administración de QUIN disminuyó los niveles de proteína del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lo que evita la estimulación del receptor de tropomiosina cinasa-B (TrkBBr) (1). La disminución en la señalización de TrkBBr evitó la activación ERK1/2 (2) y, en consecuencia, modificó la actividad del Nrf2 (por la activación indirecta de Keap1) (3). La excitotoxicidad y el incremento de ERO generó cambios conformacionales en Keap1, permitiendo que Nrf2 se dissociara y translocara al núcleo de manera compensatoria, aunque sin una eficiente unión con su secuencia consenso (4). La disminución de la unión de Nrf2/ARE redujo los niveles de enzimas de la fase II (5), así como la actividad de GSH, los procesos inflamatorios, el daño y la muerte celular (6). Por su parte, el pre-condicionamiento con SAC previno la disminución de los niveles de BDNF (7), lo que evita la reducción de la activación de ERK1/2 (8), así como la estabilización de Nrf2, su translocación y activación nuclear (de manera independiente de Keap1) (9), incrementando los niveles y la actividad de enzimas antioxidantes de la fase II (10). También preservó los niveles de GSH, lo que promueve un adecuado funcionamiento y supervivencia celular, así como la mitigación de posibles procesos oxidativos, inflamatorios y excitotóxicos (11).

8. Conclusión

Los hallazgos reportados en este trabajo demuestran que SAC ejerce un efecto protector sobre los eventos tóxicos tempranos provocados por QUIN en rebanadas corticales que reclutan respuestas antioxidantes, activación de eventos de señalización protectora y preservación de agentes neuroprotectores endógenos. Estos hallazgos son de gran relevancia, ya que apoyan el concepto de que los efectos protectores que ejercen los antioxidantes con un amplio espectro de propiedades protectoras implican la orquestación de respuestas tempranas que comprenden señales antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras específicas. Por lo tanto, los ensayos clínicos contra los eventos deletéreos que ocurren en los trastornos neurodegenerativos deben considerar el diseño de enfoques terapéuticos que exhiban una amplia gama de efectos neuroprotectores desde las primeras etapas de las condiciones patológicas.

9. Referencias Bibliográficas

- Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999) Nrf2, a Cap 'n' Collar transcription factor, regulate the induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274, 26071-26078.
- Andreyen AY, Kushnareva YE, Starkov A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70, 200-214.
- Amara SG, Fontana ACK (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International* 41, 313-318.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 7915-7922.
- Allsopp TE, Robinson M, Wyatt S, Davies AM (1994) TrkA mediates an NGF survival response in NGF-independent sensory neurons but not in parasympathetic neurons. *Gene Ther.* 1 Suppl 1, S59.
- Atale N, Gupta S, Yadav UCS, Rani V, 2014. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc* 255, 7-19.
- Balogh A, Németh M, Koloszá I, Markó L, Przybyl L, Jinno K, Szigeti C, Heffer M, Gebhardt M, Szeberényi J, Müller DN, Sétáló G, Pap M (2014) Overexpression of CREB protein protects from tunicamycin-induced apoptosis in various rat cell types. *Apoptosis* 19, 1080-1098.
- Barde YA., Lindsay RM, Monard D, Thoenen H (1978) New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. *Nature* 274, 818-818.
- Beadle GW, Mitchell HK, Nyc JF (1947) Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophane by neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA* 33, 155–158
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. (1991) Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7, 857-866.
- Berridge MJ (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal* 220, 345-360.

- Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-482.
- Besser M, Wank R (1999) Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol.* 162, 6303-6306.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4, 702–710
- Birling MC, Price J (1995). Influence of growth factors on neuronal differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 7, 878-884.
- Bohár Z, Toldi J, Fülöp F, Vécsei L (2015) Changing the face of kynurenines and neurotoxicity: therapeutic considerations. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 9772-9793.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286,1358–1362
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 134,707-716.
- Braidy N., Guillemin G.J, Grant R. (2011) Effects of Kynurenine Pathway Inhibition on NAD⁺ Metabolism and Cell Viability in Human Primary Astrocytes and Neurons. *Int J Tryptophan Res.* 4, 29–37.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MZ, Lin MZ, Juo, P., Hu, LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Bucolo C, Drago F, Maisto R, Romano GL, D'Agata V, Maugeri G, Giunta S (2019) Curcumin prevents high glucose damage in retinal pigment epithelial cells through

ERK1/2-mediated activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *J Cell Physiol* 234,17295-17304.

- Buchholz JN, Behringer EJ, Pottorf WJ, Pearce WJ, Vanterpool CK (2007). Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging Cell* 6, 285-296.

- Burton GW, Joyce A, Ingold JU (1982) First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2, 327.

-Butterfield DA (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review *Free Radic Res* 36:1307-1313.

- Carafoli E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annual Review of Biochemistry* 56, 395-433.

- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17, 164-173.

- Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T (2001) Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 33, 148-158.

- Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM (2001) Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 14661-14668.

- Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ (2005) Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 993-1000.

- Chen T, Wu Y, Wang Y, Zhu J, Chu H, Kong L, Yin L, Ma H (2017) Brain-derived neurotrophic factor increases synaptic protein levels via the MAPK/Erk signaling pathway and Nrf2/Trx axis following the transplantation of neural stem cells in a rat model of traumatic brain injury. *Neurochem Res* 42, 3073-3083.

- Chirino Y, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de Investigación Clínica* 58, 350-358.

- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623–634
- Christen Y (2000) Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 71:621S-629S.
- Christie BR, Eadie BD, Kannangara TS, Robillard JM, Shin J, Titterness AK (2008) Exercising our brains: how physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular Med.*10, 47-58.
- Colín-González AL, Ali SF, Túnez I, Santamaría A (2015) On the antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory properties of S-allyl cysteine: An update. *Neurochem Int* 89:83-91.
- Colín-González AL, Luna-López A, Königsberg M, Ali S.F., Pedraza-Chaverri J., Santamaría A (2014) Early modulation of the transcription factor Nrf2 in rodent striatal slices by quinolinic acid, a toxic metabolite of the kynurenine pathway. *Neuroscience* 260,130-139.
- Colín-González AL, Santana RA, Silva-Islas CA, Chánez-Cárdenas ME, Santamaría A, Maldonado PD (2012) The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxid Med Cell Longev* 2012,907162.
- Colonnello A, Aguilera-Portillo G, Rubio-López LC, Robles-Bañuelos B, Rangel-López E, Cortez-Núñez S, Evaristo-Priego Y, Silva-Palacios A, Galván-Arzate S, García-Contreras R, Túnez I, Chen P, Aschner M, Santamaría A (2020) Comparing the neuroprotective effects of caffeic acid in rat cortical slices and *Caenorhabditis elegans*: involvement of Nrf2 and SKN-1 signaling pathways. *Neurotox Res* 37,326-337.
- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK (2008). The Nrf2–Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246, 24-33.
- Corona-Vázquez T, Campillo-Serrano C, López M Las enfermedades neurológicas. I. Su dimensión y repercusión social. II. Depresión y demencia. III. Trauma y tumores. IV. Infecciones del Sistema Nervioso Central. *Gac Med Mex.* 2002; 138, 533-546.

- Corona, JC y Tapia R. (2005). Mecanismos de neurodegeneración. Mensaje Bioquímico 29.
- Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González DJ, Hernández-Pando, R., Maldonado, P. D., Martínez-Martínez, C. M., & Pedraza-Chaverri, J. (2007). Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1691-F1698.
- Cruz-Álvarez S, Santana-Martínez R, Avila-Chávez E, Barrera-Oviedo D, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD (2017) Apocynin protects against neurological damage induced by quinolinic acid by an increase in glutathione synthesis and Nrf2 levels. *Neuroscience* 350, 65-74.
- Curtis R, Adryan KM, Stark JL, Park JS, Compton DL , Weskamp G, Huber LJ, Chao MV, Jaenisch R, Lee KF (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 14, 1201-1211.
- Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: Oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24, 8477–8486.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9: 46–56
- Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 170-185.
- Deb A, Zamanian-Daryoush M, Xu Z, Kadereit S, Williams BR (2001) Protein kinase PKR is required for platelet-derived growth factor signaling of c-fos gene expression via Erks and Stat3. *EMBO J* 20,2487-2496.
- Deogracias R, Espliguero G, Iglesias T, Rodríguez-Peña A (2004). Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci* 26, 470-80.

- Desai A, Turetsky D, Vasudevan K, Buonanno A (2002) Analysis of transcriptional regulatory sequences of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit gene in cultured cortical neurons and transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 46374–46384.
- Dong X, Wang Y, Qin Z (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol* 30, 379-387.
- Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Pérez-De La Cruz V, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A (2010) Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine. *J Neural Transm* 117, 35-44.
- Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of Medical Research* 39, 265-276.
- Fariñas I & Reichardt, LF (1996). Neurotrophic factors and their receptors: implications of genetic studies. *Seminars in Neuroscience*, 8,133-143
- Fenn AM, Gensel JC, Huang Y, Popovich PG, Lifshitz J, Godbout JP (2014). Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: a role for primed microglia. *Biol Psychiatry* 76, 575–584.
- Figuera-Losada M, Rojas C, Slusher BS (2014). Inhibition of microglia activation as a phenotypic assay in early drug discovery. *J Biomol Screen* 19, 17–31.
- Frei B, Kim M.C, Ames B.N (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *PNAS* 87,4879-4883.
- Garoflos E, Stamatakis A, Mantelas A., Philippidi, H. Stylianopoulou F (2005) Cellular mechanisms underlying an effect of “early handling” on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain Res.* 1052, 187-195.
- García E, Limón D, Pérez-De La Cruz V, Giordano M, Díaz-Muñoz M, Maldonado PD, Herrera-Mundo MN, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A (2008) Lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, and neurochemical and behavioral deficits

in different neurotoxic models: protective role of S-allylcysteine. *Free Radic Res* 42, 892-902.

- García E, Santana-Martínez R, Silva-Islas CA, Colín-González AL, Galván-Arzate S, Heras Y, Maldonado PD, Sotelo J, Santamaría A (2014) S-allyl cysteine protects against MPTP-induced striatal and nigral oxidative neurotoxicity in mice: participation of Nrf2. *Free Radic Res* 48,159-167.

- Gary GR, Barde, YA (1996) *Physiology of the Neurotrophins* 19, 289-317.

- Gazulla J, Cavero-Nagore M. (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología* 42, 427-432.

-Ghasemi M, Schachter SC (2011). The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: A review. *Epilepsy & Behavior* 22:617-40.

- Gómez-Sierra T, Molina-Jijón E, Tapia E, Hernández-Pando R, García-Niño WR, Maldonado PD, Reyes JL, Barrera-Oviedo D, Torres I, Pedraza-Chaverri J (2014). S-allylcysteine prevents cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *J Pharm Pharmacol* 66, 1271-1281.

- Gómez-Quiroz LE Cuevas-Bahia D. (2008). Superóxido dismutasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno pp. 169-182.

- Gomes JR, Costa JT, Melo CV, Felizzi F, Monteiro P, Pinto MJ, Inácio AR, Wieloch T, Almeida RD, Graos M, Duarte CB (2012) Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons. *J Neurosci* 32, 4610–4622.

- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP (2010) Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 323-354.

- Gass P, Riva MA (2007) CREB, neurogenesis and depression. *Bioessays* 29, 957-961.

- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764-12767.

- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. In Free Radicals in the Brain. Lester Packer Leonid Prilipko Yves Christen (eds)Springer Berlin Heidelberg pp. 21-40.
- Halliwell B, S Chirico (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 57 (Suppl), 715s-725s
- Halliwell B (1999) Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr Rev* 57: 104–113.
- Halliwell B, (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry* 97 (6): 1634-1658.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Gutteridge JM C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. Oxford University Press, USA.
- Hamanaka RB, Chandel NS (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 505-513.
- Hammarström AK, Parkington HC, Tare M, Coleman HA (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization in resting and depolarized mammary and coronary arteries of guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology* 126, 421-428.
- Hansberg TW (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26, 19-54.
- Haroon E, Miller AH & Sanacora G (2016). Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 42,193–215
- Harris CM and Massey V (1997). "The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical." *J Biol Chem* 272: 8370-3379.
- Hempstead BL (2006) Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res.* 3, 19-24.
- Herrera-Mundo MN, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Andrés-Martínez L., Pérez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. (2006). S-

Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neuroscience Research* 56, 39-44.

-Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74, 214-226.

- Hohn A, Leibrock J., Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339-341.

- Hsu CC, Lin CC, Liao TS, Yin MC (2006). Protective effect of s-allylcysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 44, 393-397.

- Huang EJ, Reichardt LF (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.

- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk Receptors: roles in neuronal signal transduction*. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642.

-Huang S-HH, Duan S, Sun T, Wang J, Zhao L, Geng Z, Yan J, Sun H-JJ, Chen Z-YY (2011) JIP3 mediates TrkB axonal anterograde transport and enhances BDNF signaling by directly bridging TrkB with kinesin-1. *J Neurosci* 31, 10602–10614.

- Ide N, Matsuura H, Itakura Y (1996) Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 10, 340-341.

- Ide N, Lau BH, (1997). Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J Pharm Pharmacol* 49, 908-911

- Jain V, Baitharu I, Prasad D, Ilavazhagan G (2013) Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced memory impairment and neurodegeneration: role of BDNF/PI3K/GSK3 β pathway coupled with CREB activation. *PLoS One* 8, e62235.

- Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Nukina N (2004). Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem*, 279:11680–11685.

- Jaramillo S., Villa NA, Pineda AF, Gallego AB, Tabares P, Ceballos A. (2005). Actividad sanguínea de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en novillas a pastoreo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40, 1115-1121.

- Jhamandas JH, Harris KH (1992). Excitatory amino acids may mediate nucleus tractus solitarius input to rat parabrachial neurons. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 263, 324-330.
- Jocelyn, PC (1973) Academic Press, London and New York. Pp404 D. C. WATTS; Biochemistry of the SH Group. *Biochem Soc Trans* 1, 780–781.
- Johnson-Farley NN, Patel K, Kim D, Cowen DS, (2007) Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures. *Brain Res.* 1154, 40-49.
- Jones TM, Durrant J, Michaelides EB, Green M.P (2015). Melatonin: a possible link between the presence of artificial light at night and reductions in biological fitness, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370, 20140122.
- Jong MP, Young MH, Napapan K, Soo-Yeon L, Mi-Kyoung J J Park JM, Han YM, Kangwan N, Lee SY, Jung MK, Kim EH, Hahm KB. (2014) S-allyl cysteine alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damages by increasing cyclooxygenase-2 inhibition, heme oxygenase-1 induction, and histone deacetylation inhibition. *J Gastroenterol Hepatol* 29, 80-92
- Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJ (2005). Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 102, 9206-9211.
- Kermani P & Hempstead B (2007) Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 17, 140-143.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?. *J Exp Med* 189, 865-870.
- Kettenmann H, Ransom BR (2012) *Neuroglia*. Oxford University Press: New York, NY An authoritative textbook and master reference on all aspects of glial functioning.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR (1991) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.

- Koderá Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanezawa A, Taru N, Fujikawa M, Nagae S, Masamoto K, Maeshige, K, Ono K (2002). Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agric Food Chem* 50, 622-632.
- Kohen R, Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30, 620-650.
- Köhler C, Schwarcz R (1983). Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: A histological study. *Neuroscience*. 8, 819–835.
- Königsberg FM (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* 26, 18-25.
- Komulainen P, Pedersen M, Hänninen T, Bruunsgaard H, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Rauramaa TH, Pedersen BK, Rauramaa R (2008) BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: The DR' s EXTRA Study. *Neurobiol Learn Mem* 90, 596-603.
- Krainc D, Bai G, Okamoto S, Carles M, Kusiak JW, Brent RN, Lipton SA (1998) Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem* 273: 26218–26224
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Experimental Biology and Medicine* 200, 248-254
- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM (1997) Activation of the receptor for advanced glycation endproducts triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*, 272, 17810–17814.
- Lau A, Tian W, Whitman SA, Zhang DD (2013). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxidants Redox Signaling* 18, 91-93.
- Lau GC, Saha S, Faris R, Russek SJ (2004) Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *J Neurochem* 88: 564–575 .
- Lawson LD. (1998). Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. *Phytomedicines of Europe*. Chapter 14, pp 176-209.

- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 116, 321-361.
- Lee JM, Johnson JA (2004). An important role of Nrf2- ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37,139-143.
- Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z (2003) ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8532–8537.
- Ljubuncic P, Gochman E, Reznick A (2010). Nitrosative Stress in Aging—Its Importance and Biological Implications in NF-κB Signaling. In: Bondy S., Maiese K. (eds) *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Humana Press. Totowa, NJ. pp. 27-54.
- Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R, Fischer A, Lewin GR, Renz H (1999) Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol.* 155, 1183-1193.
- Lorigados L, Orozco S, Morales L, Estupiñán B, García I, Rocha L (2013). Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotecnología Aplicada* 30,1-8.
- Lovelace MD, Varney B, Sundaram G, Franco NF, Ng ML, Pai S, Lim CK, Guillemin GJ, Brew BJ, (2016) Current Evidence for a Role of the Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 7, 246.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Luikart BW, Zhang W, Wayman GA, Kwon CH, Westbrook GL, Parada LP (2008) Neurotrophin-dependent dendritic filopodial motility: A Convergence on PI3K Signaling. *J Neurosci.* 28, 7006-7012.
- Luján-Miras, R. (2005). Receptores metabotrópicos del glutamato: nuevas dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. *Revista de Neurología* 40, 43-53.

- Lyons MR, Schwarz CM, West AE (2012) Members of the myocyte enhancer factor 2 transcription factor family differentially regulate Bdnf transcription in response to neuronal depolarization. *J Neurosci* 32: 12780–12785.
- Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 303-314.
- Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJ, Doroshow JH, Esworthy RS (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 266, 7728-7732.
- Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando, R, Pedraza-Chaverrí J (2003). Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 35, 317-324.
- Maldonado SO, Jiménez VEN, Guapillo VMRB (2010) Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*.10,32-39.
- Martínez CD, Vargas CR, Arancibia SR (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina* 46, 229-235.
- Marín-García J. (2012). Mitochondria and their role in cardiovascular disease. Springer Science & Business Media, 474pp.
- Marty A, Neher E (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology* 367, 117-141.
- Matthews VB, Aström MB, Chan MHS, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerström T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA (2009) Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52, 1409-1418.
- Matsuzawa A., Saegusa K., Noguchi T., Sadamitsu C., Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S,

Koyasu S, Matsumoto K., Takeda K., Ichijo H (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6- ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol.* 6, 587-592.

- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montague M, Inzé D (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49, 649–667.

- Maya-López M, Rubio-López LC, Rodríguez-Alvarez IV, Orduño-Piceno J, Flores-Valdivia Y, Colonnello A, Rangel-López E, Túnez I, Prospéro-García O, Santamaría A (2020) A cannabinoid receptor-mediated mechanism participates in the neuroprotective effects of oleamide against excitotoxic damage in rat brain synaptosomes and cortical slices. *Neurotox Res* 37:126-135.

-Mehdi G, Steven CS, Ghasemi M, Schachter SC (2011). The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review, 22:617-640.

- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev Neurosci.* 22, 295-318.

- Miller, DM, Buettner GR, Aust SD (1990). Transition metals as catalysts of“autoxidation” reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 8, 95-108.

- Mitchell KJ, Tsuboi T, Rutter GA (2004). Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic beta-cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes* 53, 393-400.

- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., Carlà, V., 1988, Presence of kynurenic acid in the mammalian brain, *J Neurochem*, 51, 177–180.

- Mostafa MG, Mima T, Ohnishi ST, Mori K, (2000). S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Medica* 66, 148-151.

- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276, 12660-12666.

- Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y (1994) Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med*, 60, 214-217.

- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C (1991) *J. Immunol. Methods* 139, 271–279.
- Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H (2001) Ameliorative Effect of S-Allylcysteine, a Major Thioallyl Constituent in Aged Garlic Extract, on Learning Deficits in Senescence-Accelerated Mice. *The Journal of Nutrition* 131,1093–1095.
- Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J Neurosci* 20, 251–258.
- Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31, 1287-1312.
- Numagami Y, Ohnishi ST (2001) S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* 131,1100S-1105S.
- Olanow CW (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 16,439-444.
- Olney JW, Collins RC, Sloviter RS (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol* 44, 857-877.
- Ortega-Martínez S (2015) A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci* 8, 46.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J. (1984). Neurons containing or accumulation transmitter amino acids, in: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, , Volume 3: A Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS, A. Björklund, T. Hökfelt, and MJ Kuhar, eds. Amsterdam: Elsevier, pp 141-246A.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ (1998) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 37, 1553-1561.
- Park H, Poo M (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14, 7-23.
- Parrott JM, O'Connor JC (2015). Kynurenine 3-monooxygenase: an influential mediator of neuropathology. *Front Psychiatry*. 6: 116.

- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 272-280.
- Pérez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, González-Cortés C (2006) Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Research Bulletin* 68, 379-383.
- Pérez-De La Cruz V, Konigsberg M, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Mundo N, Díaz-Muñoz M, Morán J, Fortoul-van der Goes T, Rondán-Zárate A, Maldonado PD, Ali SF, Santamaría A (2008) Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic /energetic deficit synergic model in rats. *Eur J Neurosci* 27,1075-1085.
- Pérez-De La Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A (2012) Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res* 5,1-8.
- Pérez MA, Arancibia SR (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Archivos de Neurociencias* 12, 45-54
- Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A (2004) S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45, 1175-1183.
- Petrelli F, Bezzi P (2016). Novel insights into gliotransmitters. *Curr Opin Pharmacol* 26: 138–145
- Peuchen S, Bolaños JP, Heales SJ, Almeida A, Duchon MR, Clark JB (1997). Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 52, 261-281.
- Piers TM, Heales SJ, Pocock JM (2011). Positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5 down-regulates fibrinogen-activated microglia providing neuronal protection. *Neurosci Lett* 505: 140–145.
- Poduslo JF, Curran GL (1996) Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 36, 280-286.

- Powers S. K, Lennon S. L (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings-Nutrition Society*. 58,1025–1033.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer, JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296, 295–309.
- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol* 94, 1062-1069.
- Ray B, Chauhan N.B, Lahiri D.K (2011). The “Aged Garlic Extract”(AGE) and One of its Active Ingredients S-Allyl-L-Cysteine (SAC) as Potential Preventive and Therapeutic Agents for Alzheimer’s Disease (AD). *Curr Med Chem*, 18, 3306–3313.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545–1564.
- Reus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. (2015). The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience* 300: 141–154
- Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P (2007) Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappaB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1770:989-996.
- Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82:297-325.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L MS (2013) Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* 8:56-65. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
- Robitaille R, Charlton MP (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *The Journal of Neuroscience* 12, 297-305.

- Rodríguez, P. (2009). Formación de especies reactivas de oxígeno por interferencia en la expresión de la glutamatocisteína ligasa. Tesis de Maestría. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca, España.
- Rodrigues C, Percival S (2019) Immunomodulatory Effects of Glutathione, Garlic Derivatives, and Hydrogen Sulfide. *Nutrients* 11, 295.
- Salehi A., Delcroix JD, Mobley WC (2003) Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 26, 73-80.
- Salehi A, Delcroix JD, Swaab DF (2004) Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm. (Vienna).* 111, 323-345.
- Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S (2001) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12:2693-2696.
- Santana-Martínez RA, Silva-Islas CA, Fernández-Orihuela Y, Barrera-Oviedo D, Pedraza-Chaverri J, Hernández-Pando R, Maldonado PD (2019) The therapeutic effect of curcumin in quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats is associated with BDNF, ERK1/2, Nrf2, and antioxidant enzymes. *Antioxidants (Basel)* 8,388-407.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11,173–186.
- Schinder AF, Poo M (2000) (2001) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 23, 639-645.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Jr, Köhler C. (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* 35,19–32.
- Schwarcz R., Pellicciari R. (2002) Manipulation of Brain Kynurenines: Glial Targets, Neuronal Effects, and Clinical Opportunities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303(1):1-10.
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ (2012) Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci* 13:465-477.
- Segura T, Galindo MF, Rallo-Gutiérrez B, Ceña V, Jordán J (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Neurología* 36, 1047-1057.

- Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling* 6, 289-300.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 68, 821-61.
- Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini M.P, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson A.D (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15, 477-491.
- Shi H, Jing X, Wei X, Perez RG, Ren M, Zhang X, Lou H (2015) S-allyl cysteine activates the Nrf2-dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury in vitro and in vivo. *J Neurochem* 133:298-308.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews* 45, 250-265.
- Squinto SP, Trevor N, Stitt TN, Aldrich TH , Davis SM, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, ME., Furth ME, Valenzuela DM PS, Yancopoulos DG (1991) TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65, 885-893
- Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Sánchez-Garibay C, Rojas-Morales P, Galván-Arzate S, Buelna-Chontal M, Pavón N, Pedraza-Chaverri J, Königsberg M, Zazueta C (2019) Sulforaphane protects from myocardial ischemia-reperfusion damage through the balanced activation of Nrf2/AhR. *Free Radic Biol Med* 143, 331-340.
- Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM (2004). Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Journal of Child Neurology* 19, 343-360.
- Snider WD (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24, 1217-1281.

- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Research Reviews* 26, 113-135.
- Song H, Cui J, Mossine VV, Greenlief CM, Fritsche K, Sun GY, Gu Z (2020) Bioactive components from garlic on brain resiliency against neuroinflammation and neurodegeneration. *Exp Ther Med* 19,1554-1559.
- Stone TW (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45,309–379.
- Stone TW (2001). Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicol* 39, 61-73.
- Stone TW, Mackay GM, Forrest CM, Clark CJ, Darlington LG (2003) Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med* 41, 852-859.
- Stone TW, Forrest CM, Darlington LG (2012). Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *FEBS J* 279, 1386–1397.
- Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM (2006). Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 40, 1683-1692.
- Sumimoto H, Miyano K, Takeya R (2005). Molecular composition and regulation of the Nox family NAD (P) H oxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 677-686.
- Szewczyk A, Wojtczak L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacological reviews* 54, 101-127.
- Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe, Y, Mizuno T, Suzumura A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* 281, 21362–21368
- Takeuchi H, Jin S, Suzuki H, Doi Y, Liang J, Kawanokuchi J, Mizuno T, Sawada M, Suzumura A. (2008). Blockade of microglial glutamate release protects against ischemic brain injury. *Exp Neurol* 214, 144–146.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20: 709–726

- Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B (2001). Protein synthesis-dependent and independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276, 37585-37593.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CES, Alves LB, Porciúncula LO, Emanuelli T, Souza DO (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40, 621-627.
- Taylor DL, Jones F, Kubota ES, Pocock JM (2005). Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J Neurosci* 25, 2952–2964.
- Tejeda GS, Ayuso-Dolado S, Arbeteta R, Esteban-Ortega GM, Vidaurre OG, Diaz-Guerra M (2016) Brain ischaemia induces shedding of a BDNF-scavenger ectodomain from TrkB receptors by excitotoxicity activation of metalloproteinases and gammasecretases. *J Pathol* 238, 627–640.
- Thimmulappa KR, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush MA, Liby KT, Sporn MB, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S. (2006) Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochem Biophys Res Commun* 351:883-889.
- Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research* 62, 5196-5203.
- Thoenen H (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593-8.
- Thoenen H (2000) Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res*, 128, 183-191
- Tong K, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M (2007) Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* 27, 7511-7521.
- Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, Giros B, Mechawar N. (2014 a). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation* 11,12.

- Torres-Platas SG, Cruceanu C, Chen GG, Turecki G, Mechawar N (2014 b). Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun* 42, 50–59.
- Trifaró JM, Vitale ML (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends in Neuroscience* 16, 466-472.
- Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD (2002) From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9, 224-237.
- Ussher JR, Jaswal JS, Lopaschuk GD, 2012. Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circ Res* 111, 628-641.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7, 65-74.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- Vámos E, Fejes A, Koch J, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Párdutz A, Vécsei L. (2010) Kynurenate derivative attenuates the nitroglycerin-induced CamKIIalpha and CGRP expression changes. *Headache* 50, 834–843.
- Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J (2013) Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov* 12, 64-82
- Verkharatsky A, Butt A (2014) *Glial Physiology and Pathophysiology*. Wiley-Blackwell: West Sussex, UK A masterful compendium of all details pertaining to glial function and dysfunction.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31, 126-133.
- Vidaurre OG, Gascón S, Deogracias R, Sobrado M, Cuadrado E, Montaner J, Rodriguez-Peña A, Diaz-Guerra M (2012) Imbalance of neurotrophin receptor

isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis* 3: e256

-Vidaurre OG, Gascon S, Deogracias R, Sobrado M, Cuadrado E, Montaner J, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M (2012). Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis*. 3,256

- Villanueva R (2013). Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast*. 2013, 873278.

- Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD (2010) Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal* 13,1699-1712.

- Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annual Review of Pathology* 5, 297-348.

- Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Weickert CS (2006). BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampus and temporal cortex during the human lifespan. *Gene Expression Patterns* 6, 941-951.

- Wolfensberger M, Amsler U, Cuénod M, Foster AC, Whetsell WO, Schwarcz R (1983) Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue, *Neurosci Lett*, 41, 247–251.

- Xiao N, Le QT (2016) Neurotrophic factors and their potential applications in tissue regeneration. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 64, 89-99.

- Xu XY, Pan Z, Shen G, Kim JH, Yu S, Khor TO, Li W, Jianjie M, Kong ANT (2006) Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther*, 5, 1918-1926.

- Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H (2006) Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 402-406.

- Yan CK, Zeng FD (2005). Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 5, 61-69.
- Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gómez-Pinilla F (2003). Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res.* 987, 93-99.
- Numagami Y, Ohnishi ST (2001). S-Allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *The Journal of Nutrition*, 131, 1100–1111.
- Yuste R, Katz LC (1991). Control of postsynaptic Ca^{2+} influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6, 333-344.
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20, 5671-5678.