



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO POST-LESIÓN DE LA CURCUMINA EN UN MODELO DE
NEURODEGENERACIÓN EN ESTRIADO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RICARDO ALBERTO SANTANA MARTÍNEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. ENERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 09 de septiembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SANTANA MARTÍNEZ RICARDO ALBERTO** con número de cuenta **302028210**, con la tesis titulada **"EFECTO POST-LESIÓN DE LA CURCUMINA EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN EN ESTRIADO DE RATA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**:

Presidente: DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DRA. MIREYA ALCARAZ ZUBELDIA
Secretario: DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA
Suplente: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Suplente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de diciembre de 2013

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS:

SE AGRADECE AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

SE AGRADECE AL **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TEGNOLOGÍA (CONACyT)** POR LA BECA (No. 323969) OTORGADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO PARCIALMENTE POR UN DONATIVO DE **CONACyT No. 103527.**

SE AGRADECE A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

- DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
- DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA
- DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Enfermedades neurodegenerativas.....	5
1.2. Excitotoxicidad.....	6
1.2.1. Glutamato.....	6
1.2.2. Receptores de glutamato.....	7
1.2.3. Recaptura de glutamato.....	9
1.3. Ca ²⁺ intracelular.....	9
1.3.1. Regulación del Ca ²⁺ intracelular.....	10
1.3.2. Aumento en los niveles de Ca ²⁺	10
1.4. Estrés oxidante.....	12
1.4.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	14
1.4.2. Producción de ERO.....	14
1.4.3. Especies reactivas de nitrógeno (ERN).....	16
1.4.4. Daño a macromoléculas por ERO y ERN.....	18
1.4.5. Cerebro en desventaja ante el estrés oxidante.....	19
1.5. Ácido quinolínico (QUIN).....	20
1.5.1. Mecanismo de acción del QUIN.....	22
1.5.2. El QUIN en la neurodegeneración estriatal.....	23
1.6. Antioxidantes.....	23
1.7. Curcumina (CUR).....	24
1.7.1. Propiedades estructurales de la CUR: propiedades antioxidantes.....	26
1.8. Vía Nrf2/ARE.....	26
1.8.1. Regulación de la vía Nrf2/ARE.....	27
1.8.2. Enzimas de Fase II.....	28
1.9. Glutación (GSH).....	28
1.9.1. Funciones neuroprotectoras del GSH.....	29
1.9.2. Síntesis del GSH.....	30
1.9.3. Enzimas de Fase II relacionadas a la homeostasis del GSH.....	31
2. ANTECEDENTES	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	35
5.1. Objetivo general.....	35
5.2. Objetivos particulares.....	35
6. METODOLOGÍA	36
6.1. Reactivos.....	36
6.2. Animales.....	36
6.3. Lesión intraestriatal.....	37
6.4. Diseño experimental.....	38
6.5. Valoración motora.....	38

6.5.1. Prueba de simetría motora	38
6.5.2. Conducta de rotación.....	39
6.6. Obtención de los cerebros para las tinciones de Hematoxilina & Eosina (H&E), Fluoro-Jade B (FJ-B), inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.	39
6.7. Tinción H&E.....	40
6.8. Tinción fluoro-jade B (FJ-B).....	40
6.9. Inmunohistoquímica.....	40
6.10. Obtención de la fracción nuclear para la determinación de Nrf2.	41
6.11. Análisis por Western Blot	41
6.12. Obtención de tejido para la medición de la actividad enzimática y niveles de glutatión	42
6.13. Actividad enzimática.....	42
6.13.1. Glutatión peroxidasa (GPx).....	42
6.13.2. Glutatión reductasa (GR)	43
6.13.3. Glutatión S-transferasa (GST)	43
6.13.4. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	43
5.13. Niveles de GSH.....	44
5.14. Análisis estadístico.....	44
7. RESULTADOS	45
7.1. Valoración motora.....	45
7.2. Cambios histológicos en las células estriatales	48
7.3. Valoración de la degeneración de las células del estriado	50
7.4. Niveles de Nrf2 en fracciones nucleares en estriado de rata	52
7.5. Porcentaje de proteínas de fase II en el estriado de rata	53
7.6. Actividad de las proteínas de fase II	56
7.7. Niveles de GSH en estriado de rata	57
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	69
9. REFERENCIAS.....	70

RESUMEN

El ácido quinolínico (QUIN), un agonista competitivo endógeno de los receptores NMDA, es considerado una excitotoxina, y su administración intraestriatal en ratas ha sido utilizado para reproducir algunas alteraciones bioquímicas, conductuales y morfológicas similares a las observadas en algunas enfermedades neurodegenerativas. El QUIN induce selectivamente la muerte de las neuronas espinosas del estriado, debido a la sobreactivación de los receptores NMDA (excitotoxicidad), lo cual está relacionado a un estado de estrés oxidante agudo. El factor de transcripción Nrf2 juega un papel crucial en la protección celular contra el estrés oxidante, ya que modula la expresión de varios genes involucrados en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de especies electrófilas, incluyendo la hemo-oxigenasa (HO-1), la glutatión S-transferasa (GST), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la gama-glutamil cisteína ligasa (γ -GCL), entre otros. La curcumina (CUR) es el principal polifenol derivado del rizoma de la *Curcuma longa* y sus propiedades biológicas como antioxidante directo (atrapador de radicales libres) e indirecto (inductor de Nrf2) están bien establecidas. Además, la CUR es altamente lipofílica, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a cerebro. En este contexto, evaluamos el efecto terapéutico de la CUR en un modelo de neurodegeneración con QUIN en el estriado de rata.

Las ratas fueron infundidas intraestriatalmente con QUIN (240 nmol/ μ l) y 24 h después a la inyección, recibieron CUR (400 mg/kg *i.g.*) diariamente (cada 24 h) durante 6 días consecutivos. El tratamiento con CUR disminuyó significativamente la degeneración neuronal y las alteraciones morfológicas inducidas por el QUIN, reduciendo el número de células lesionadas. La administración de CUR también ayudó a recuperar el uso de ambas extremidades posteriores en los animales lesionados, mientras que el número de contactos con la extremidad posterior ipsilesionada disminuyó (20 % menos comparado con el grupo QUIN) y redujo el número de giros ipsilaterales. Esta mejoría en las pruebas de conducta, se relacionó con el incremento observado a los 7 días en los niveles de Nrf2 en extractos nucleares, y con el incremento en los niveles de glutatión reducido (GSH)

(medido a los 7 días). Se observó que el tratamiento con CUR aumentó tanto el nivel de expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH tales como la GPx, GR y γ -GCLc, así como la actividad enzimática de la GPx, GR, GST y G6PD (ambas determinaciones hechas a los 7 días). Dado que la regulación de todas las enzimas que mostraron cambios en su cantidad de proteína y en su actividad enzimática es mediada por Nrf2, se sugiere que la inducción de Nrf2 puede ser un elemento clave en el mecanismo de antioxidante indirecto exhibido por la CUR. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con CUR puede constituir una herramienta terapéutica para disminuir algunas de las características de los eventos neurodegenerativos en los cuales el equilibrio del estado oxido-reducción es crucial para la supervivencia neuronal. Sin embargo, más estudios son necesarios para elucidar el mecanismo de acción preciso de la CUR que expliquen su efecto protector ante el reto tóxico inducido por el QUIN.

ABSTRACT

Quinolinic acid (QUIN), an endogenous competitive agonist of NMDAR, is considered an excitotoxin, and its intrastriatal administration to rats has been used to reproduce some biochemical, behavioral and morphological alterations similar to those observed in some neurodegenerative disorders. QUIN induces selective spiny neurons death in the striatum due to over activation of NMDA receptor (excitotoxicity), which has been related to acute oxidative stress. Transcriptional factor Nrf2 plays a critical role in the cellular protection against oxidative stress. It modulates the expression of several genes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) and electrophile species, including hemeoxygenase-1 (HO-1), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and gamma glutamyl cysteine ligase (γ -GCL). Curcumin (CUR) is a major polyphenol derived from the rhizome *Curcuma longa* and its biological properties as direct (free radical scavenger) and indirect (Nrf2 inducer) antioxidant are well known. Additionally, CUR is highly lipophilic and is able to reach the brain. In this context, we studied the therapeutic effect of CUR in a neurodegenerative model produced by QUIN in rats.

Rats were intrastriatally infused with QUIN (240 nmol/ μ l) and 24 h after, received CUR (400 mg/kg, i.g.) daily during 6 consecutive days. CUR treatment significantly decreased neuronal degeneration and QUIN-induced striatal morphological alterations by reducing the number of lesioned cells. CUR administration also partially recovered the ability of QUIN-lesioned animals to use both forelimbs, while decreased the single use of the ipsilesionated forelimb (20 % below the QUIN condition) and reduced the number of ipsilateral turns. This reduced impairment in behavioral performance could be related to both to increase of Nrf2 in nuclear extract at 7 day and increase of GSH level (at 7 day). CUR treatment significantly to increase glutathione metabolism-related amount of protein (GPx, GR, GST, G6PD and γ -GCLc) and activity enzymatic of GPx, GR, GST γ G6PD (both, at 7 day after QUIN microinjection). Since the regulation of all enzymes exhibited changes in amount of protein and enzyme activity is mediated by Nrf2, it suggested that induction of Nrf2 may be a key element in the indirect antioxidant mechanism exhibited by the CUR.

Our results suggest that treatment with CUR can be a therapeutic tool for decreasing some of the characteristics of neurodegenerative events in which the maintenance of the redox state is crucial for neuronal survival. However, more studies are needed to elucidate the precise mechanism of action of CUR to explain their protective effect against the toxic challenge induced by QUIN.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades neurodegenerativas

El incremento en la esperanza de vida de los humanos en los países industrializados y en desarrollo, está acompañada por un inevitable y prevalente incremento de enfermedades que ocasionan alteraciones en el tejido cerebral (Schliebs, 2004). La muerte o degeneración neuronal es un fenómeno central durante el envejecimiento, y ocurre de manera prematura en el curso de numerosos padecimientos crónicos que afectan el cerebro y la médula espinal. Entre los padecimientos crónicos más frecuentes se encuentran las *enfermedades neurodegenerativas* como son: la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Tapia et al., 1999).

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema nervioso con diferente etiología genética y fenotipos clínicos, frecuentemente relacionadas con el envejecimiento. Las consecuencias de la neurodegeneración en estos padecimientos son devastadoras. Afectan principalmente las funciones motoras, así como las funciones superiores del sistema nervioso tales como la memoria, los mecanismos de pensamiento, las emociones, la conciencia, el lenguaje, la personalidad y la orientación espacio-tiempo (Pasantes et al., 1999). A pesar de esto, tienen en común: 1) el curso progresivo de los síntomas; 2) el reflejo de la degeneración paulatina de una región cerebral; 3) que las estrategias terapéuticas son sintomáticas en muchos de los casos, y paliativas en todos ellos; y 4) generan discapacidad y padecimiento físico y psíquico, entre quienes las padecen y en menor medida a sus familiares y/o cuidadores.

Aunque la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son esporádicas, algunas pueden atribuirse a mutaciones genéticas específicas que afectan una amplia variedad de proteínas. Sin embargo, evidencia sustancial apunta a la *excitotoxicidad* como un mecanismo fundamental implicado en la degeneración neuronal (*ver más adelante*) (Dong et al., 2009).

En los últimos años se ha demostrado que los aminoácidos excitadores participan de manera fundamental en el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas. Las neuronas que contienen éstos aminoácidos juegan un papel crucial en las funciones fisiológicas tales como el aprendizaje y la memoria. La sobre-estimulación de los receptores de aminoácidos excitadores resulta en grandes alteraciones irreversibles en el funcionamiento sináptico neuronal (Dong et al., 2009).

No están claras las causas y los mecanismos de la muerte neuronal en estas enfermedades; sin embargo, se han propuesto tres factores entre sí que parecen jugar un papel importante en el evento excitotóxico: 1) la sobreactivación de los receptores para aminoácidos excitadores, 2) un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y 3) la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Coyle & Puttfarcken, 1993). La relación entre estos factores son múltiples y una alteración en ellos puede generar cambios que lleven a la muerte neuronal.

1.2. Excitotoxicidad

Al mecanismo de neurodegeneración originado por la sobreactivación de los receptores de glutamato, ya sea por este aminoácido o sus análogos, se le llama **excitotoxicidad** (Sims & Zaidan, 1995). Este mecanismo se acompaña de otros eventos (aumento de Ca^{2+} citosólico y producción de ERO) que en conjunto originan el deterioro y la muerte neuronal.

1.2.1. Glutamato

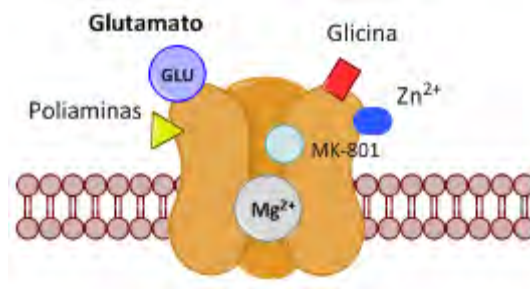
El glutamato es el principal aminoácido neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos (Greenamyre, 1986). Se calcula que es el responsable del 75% de la transmisión excitadora rápida. Comparado con otros neurotransmisores, sus niveles son muy altos, cerca de 5-10 mmol/kg (Butcher & Hamberger, 1987), casi 1000 veces mayor que otros neurotransmisores como la dopamina (Sheldon & Robinson, 2007). Dado que la sinápsis excitatoria comprende un 80-90% de la sinapsis total en el cerebro, la regulación del su metabolismo del glutamato tanto en neuronas como en astrocitos es de suma

importancia, y un desajuste en él ocasionaría graves alteraciones en la respuesta excitatoria del cerebro (McKenna, 2007).

1.2.2. Receptores de glutamato

Se han clonado y caracterizado varias clases de receptores de glutamato: los que están acoplados a canales iónicos (receptores ionotrópicos) y los que están acoplados a proteína G (receptores metabotrópicos) (Hollman & Heinemann, 1994). Dentro de los *receptores ionotrópicos* hay dos subtipos, denominados de acuerdo a su agonista farmacológico (ya que el agonista endógeno de todos ellos es el glutamato); los que reconocen al N-metil-D-aspartato (NMDA) y los que no responden al NMDA, pero que son activados a su vez por el ácido kaínico o por el α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (Nakanishi, 1992). Tanto los receptores NMDA como los no-NMDA (AMPA y AK) están presentes en la membrana plasmática de las neuronas postsinápticas glutamatérgicas (Tapia & Corona, 2005).

Los receptores NMDA tienen propiedades únicas con respecto a los otros receptores de glutamato, su apertura depende de voltaje y de la extrusión de un ion de Mg^{2+} que los mantiene bloqueados. Además, tienen varios sitios a los cuales se unen diferentes ligandos como: a) el sitio de unión para el glutamato; b) el sitio de unión para la glicina (modulador alostérico), que facilita la acción del glutamato; c) el sitio de unión a poliaminas, que provoca efectos potenciadores o inhibidores (dependiendo de la poliamina); d) el sitio al que se une el Mg^{2+} y al cual se une el (+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)cicloheptano-5,10-imina maleato (MK-801) (ambos moduladores alostéricos negativos), este último un potente antagonista farmacológico no competitivo del receptor; y e) un sitio al cual se une el Zn^{2+} (Nakanishi, 1992) (**Esquema 1**).



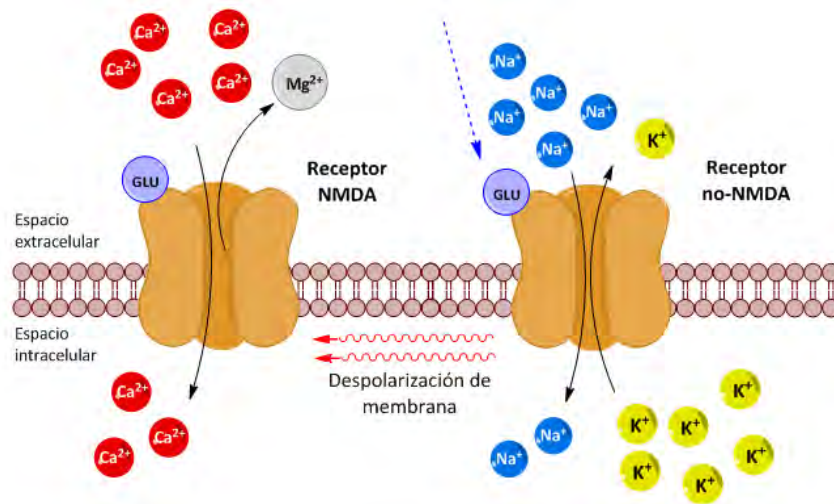
Esquema 1. Receptor NMDA y sus diferentes sitios de unión; glutamato (GLU), glicina, poliaminas, Mg^{2+} , Zn^{2+} y MK-801.

Los receptores NMDA son permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , mientras que los receptores AMPA y AK lo son a Na^+ y K^+ . Todos los receptores ionotrópicos se encuentran formados por diferentes subunidades, y cambios en su conformación alteran su capacidad permeable y su actividad como receptor (Coyle & Puttfarcken, 1993) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Subunidades de los receptores ionotrópicos. NMDA: N-metil D-aspartato, AMPA: amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropionato, AK: ácido kaínico.

Receptores Ionotrópicos		
NMDA	AMPA	AK
NR1	GluR1	GluR5
NR2A	GluR2	GluR6
NR2B	GluR3	GluR7
NR2C	GluR4	KA1
NR2D		KA2

La activación de los receptores no-NMDA provoca la entrada de Na^+ y la salida de K^+ , y la subsiguiente despolarización de la membrana plasmática; promoviendo la remoción del Mg^{2+} que normalmente se encuentra bloqueando el canal del receptor NMDA. Una vez que el Mg^{2+} es removido, la unión del glutamato y su co-agonista (la glicina) a sus respectivos sitios activa completamente los receptores NMDA, permitiendo la entrada de más Na^+ y de Ca^{2+} a la célula (Estrada-Sánchez et al., 2008). En otras palabras, la presencia simultánea de receptores de glutamato, NMDA y no-NMDA, en la misma neurona, funciona de manera secuencial: la despolarización rápida, inicial y mediada por los receptores no-NMDA, es seguida por una despolarización prolongada debida a la activación de receptores NMDA (**Esquema 2**).



Esquema 2. Función secuencial de los receptores NMDA y no-NMDA. La unión del glutamato (GLU) a sus receptores no-NMDA (flecha azul punteada), ocasiona una despolarización en la membrana, provocando la salida del Mg^{2+} que mantenía bloqueado al receptor NMDA; así puede llevarse la entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona.

1.2.3. Recaptura del glutamato

Una vez que el glutamato activa a sus receptores, éste debe ser eliminado del espacio sináptico. De los tres mecanismos conocidos de eliminación de neurotransmisores: difusión, degradación enzimática y recaptura, esta última es el mecanismo más importante en la remoción del glutamato y cumple una doble función: por un lado termina con la acción sináptica del glutamato y por otro permite su recuperación para que ésta molécula pueda ser eventualmente reutilizada (Tapia & Corona, 2005).

La recaptura de glutamato al interior de las células se lleva a cabo por transportadores de alta afinidad que dependen del gradiente iónico de Na^+/K^+ generado por la ATPasa de Na^+/K^+ . De esta manera logran transportar el glutamato desde el espacio sináptico al interior de las neuronas y las células gliales, manteniendo regulada su concentración extracelular por debajo de los niveles excitotóxicos (Shigeri et al., 2004).

1.3. Ca^{2+} intracelular

El Ca^{2+} en las neuronas actúa como un segundo mensajero, integrando múltiples funciones celulares tales como la liberación de neurotransmisores, la expresión de genes, la proliferación, la excitabilidad y la regulación de la muerte celular (Buchholz et al., 2007).

Por tanto, su homeostasis es uno de los elementos clave para determinar la supervivencia o la degeneración neuronal.

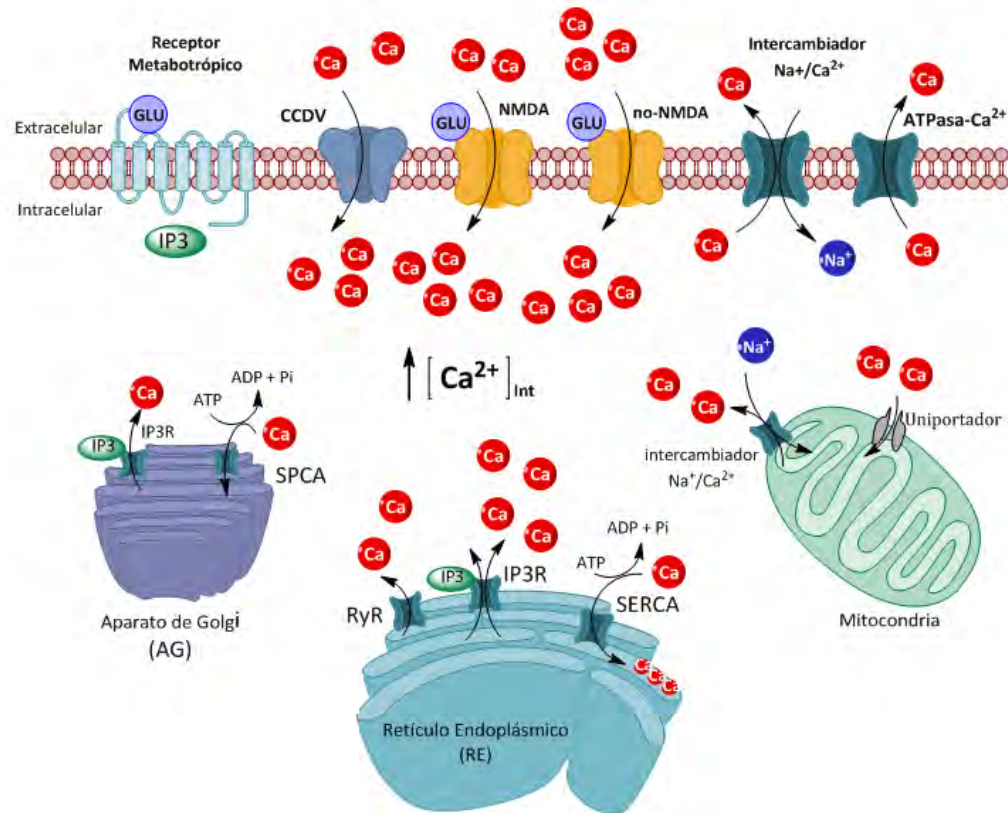
1.3.1 Regulación del Ca^{2+} intracelular

La concentración de Ca^{2+} intracelular se regula por secuestro, ya sea por proteínas de unión específica ó por organelos de almacenamiento (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria). El secuestro rápido del Ca^{2+} citoplasmático se lleva a cabo a través de proteínas que se unen a él, como la calbindina D-28k, la calretinina y la parvalbúmina (Berridge et al., 2003). El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi secuestran el Ca^{2+} mediante una ATPasa de Ca^{2+} retículo endoplásmico y una ATPasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ secretora, respectivamente; permitiendo amortiguar cambios en su concentración (Fan et al., 2008). Por su parte, la mitocondria secuestra e internaliza Ca^{2+} libre mediante un uniportador de Ca^{2+} y lo libera a través de un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Wojda et al., 2008). Estos mecanismos serían a la larga insuficientes si no se transportara el catión hacia afuera de la célula, lo cual ocurre mediante otra ATPasa de Ca^{2+} o por un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ambos localizados en la membrana plasmática. El Na^+ que penetra por este último mecanismo a su vez es expulsado por la ATPasa de Na^+/K^+ (Pasantes et al., 1999).

1.3.2. Aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular

Como se ha mencionado, un exceso de glutamato en el espacio sináptico, ocasiona un aumento en la entrada de Ca^{2+} , directamente a través de la activación de los receptores que conducen $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (receptores NMDA y algunos receptores AMPA y AK) o indirectamente a través de la activación secundaria de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Mattson, 2007). Pero además, el incremento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático aumenta cuando el glutamato activa sus receptores metabotrópicos generando inositol-(1, 4, 5) trifosfato, lo que provoca la liberación de Ca^{2+} desde sus sitios de almacenamiento intracelular (Berridge et al., 2003). El aumento de Ca^{2+} en el citoplasma, libera más Ca^{2+} por los receptores de rianodina. Por otra parte, la despolarización de la membrana ocasiona la entrada de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Aunque los mecanismos de liberación de Ca^{2+} estén funcionando

(ATPasa- Ca^{2+} y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), al igual que los de almacenamiento celular: ATPasa de Ca^{2+} retículo endoplásmico y la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ secretora; éstos resultan insuficientes en función, por lo que la concentración de Ca^{2+} aumenta considerablemente, contribuyendo al daño y la muerte celular (Wojda et al., 2008) (**Esquema 3**).



Esquema 3. Fuentes que contribuyen al aumento del Ca^{2+} intracelular. La activación de los receptores NMDA y no-NMDA (AMPA y AK) generan la entrada directa e indirecta de Ca^{2+} , mientras que la activación de los receptores metabotrópicos, al generar inositol-(1, 4, 5)-trifosfato (IP3), ocasiona la salida de Ca^{2+} desde los organelos de almacenamiento intracelular a través de la interacción del IP3 con sus receptores (IP3R). RyR: receptores de rianodina, CCDV: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, SERCA: ATPasa de Ca^{2+} retículo sarco-endoplásmico y SPCA: ATPasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ secretora.

La liberación del Ca^{2+} desde la mitocondria recibe particular atención, no sólo por su capacidad de liberar este catión lentamente a través del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sino porque la acumulación excesiva de Ca^{2+} mitocondrial ocasiona una serie de eventos críticos para la supervivencia de la neurona. El Ca^{2+} secuestrado en la mitocondria es conducido por el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, que a su vez despolariza la membrana. Esta reducción en el gradiente electroquímico desacopla la cadena transportadora de electrones y disminuye la

síntesis de ATP (Gunter & Pfeiffer, 1990). La disminución en los niveles de ATP durante el proceso excitotóxico es fatal para la neurona, ya que: 1) se afectan los mecanismos de liberación de Ca^{2+} citoplasmático (realizado por la ATPasa de Ca^{2+}); 2) se inhabilitan las ATPasas que introducían Ca^{2+} al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi; 3) se favorece la despolarización de la membrana plasmática generando la entrada de más Ca^{2+} ; y 4) en respuesta a una excesiva acumulación de Ca^{2+} mitocondrial se induce la apertura del poro de permeabilidad transitoria. Este poro ocasiona un incremento no específico en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, posible ruptura de la membrana externa y un severo hinchamiento mitocondrial (Foster et al., 2006). Cuando el poro se encuentra abierto transitoriamente, la liberación del citocromo c desde el espacio intermembranal mitocondrial puede activar las caspasas 9 y 3, y conducir a la neurona a una muerte celular programada (apoptosis). Sin embargo, si su apertura es prolongada, se induce una muerte rápida por necrosis (Nicotera & Lipton, 1999; Lipton & Nicotera, 1998).

Como consecuencia del desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones, se producen ERO, que generan un estrés oxidante (*ver más adelante*) en la mitocondria, contribuyendo a su deterioro.

El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular también provoca la activación de algunas enzimas como: proteasas, lipasas y endonucleasas; que contribuyen a la degeneración de diferentes componentes celulares, llevando finalmente a la muerte neuronal (Rosa & Rapoport, 2009; Dorado-Martínez et al., 2003). Todos estos eventos, desencadenan cambios irreparables en la neurona, conduciéndola a su deterioro y a su muerte. Mientras no cese la sobreactivación de los receptores, se repetirá el mismo patrón de muerte en varias neuronas hasta presentar daño local y generalizado, que se verá reflejado en cambios motores conductuales del individuo.

1.4. Estrés oxidante

Los organismos mantienen un balance redox constante, preservando el equilibrio entre la producción de especies oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular

y los sistemas de defensa antioxidantes (enzimáticos y no-enzimáticos). La pérdida en este balance lleva a un estado de **estrés oxidante**, caracterizado por un aumento en los niveles de radicales libres y especies oxidantes que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular (Dorado-Martínez et al., 2003). Se ha reportado que el estrés oxidante juega un papel fundamental en las patologías neurodegenerativas (Migliore & Coppedé, 2009).

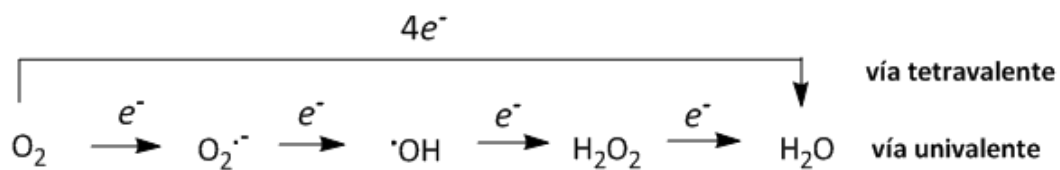
Un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular o atómico más externo, y que es capaz de coexistir independientemente (Halliwell, 2006). Estas especies se consideran “reactivas”, ya que pueden reaccionar con cualquier molécula vecina. En biología toman importancia las ERO y las ERN (Valko et al., 2007) (**Tabla 2**). No todas las especies reactivas son radicales libres, ya que algunas no presentan esta característica, pero su importancia radica en que se pueden transformar fácilmente en radicales libres, lo que les confiere la capacidad de ser dañinas para la célula (Kohen & Nyska, 2002).

Tabla 2. Especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) más comunes en los sistemas biológicos.

(ERO)		(ERN)	
RADICALES		RADICALES	
Anión Superóxido	$O_2^{\cdot-}$		
Radical Hidroxilo	OH^{\cdot}		
Radical Peroxílo	OO^{\cdot}	Óxido Nítrico	NO^{\cdot}
Radical Perhidroxilo	OOH^{\cdot}	Radical Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}
Radical Alcoxilo	OR^{\cdot}	Nitrato	NO_3^{\cdot}
Radical Dióxido de carbono	$CO_2^{\cdot-}$		
Oxígeno singulete	$O_2^1\Sigma_g$		
NO-RADICALES		NO-RADICALES	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Ácido nitroso	HNO_2
Acido hipocloroso	$HOCl$	Catión nitrosilo	NO^+
Ozono	O_3	Anión nitroxilo	NO^-
Oxígeno singulete	$O_2^1\Delta_g$	Tetróxido de dinitrógeno	N_2O_4
Peróxidos orgánicos	$ROOH$	Trióxido de nitrógeno	N_2O_3
Peroxinitrito	$ONOO^-$	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Peroxinitrato	O_2NOO^-	Peroxinitrato	O_2NOO^-
Ácido peroxinitroso	$ONOOH$	Ácido peroxinitroso	$ONOOH$

1.4.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO representan la clase más importante de especies oxidantes en los sistemas vivos (Miller et al., 1990). El O_2 tiene una configuración electrónica única y es un diradical. En condiciones fisiológicas, el O_2 se reduce a H_2O por el complejo de la citocromo oxidasa, que transfiere $4 e^-$ al O_2 (vía tetravalente). Sin embargo, menos del 5% del O_2 puede reducirse univalentemente a H_2O generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) como intermediarios (Halliwell, 2006) (**Esquema 4**).



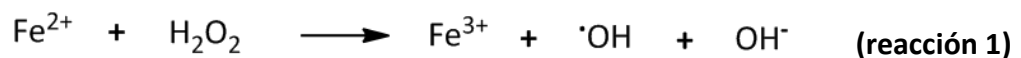
Esquema 4. Vía de reducción tetravalente (arriba) y univalente (abajo) del O_2 .

1.4.2. Producción de ERO

La mitocondria es la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$, generando aproximadamente el 85% del total (Dröge, 2002); mientras que el 15% de $O_2^{\cdot-}$ restante es generado por varias oxidasas citosólicas como la NADPH oxidasa o la xantina oxidasa (Sumimoto, 2008).

En condiciones fisiológicas, durante el transporte de electrones en los complejos mitocondriales (I-IV), del 2-5% de los electrones escapan para reaccionar directamente con el O_2 . Esto ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (Boveris & Chance, 1973). Sin embargo, la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria como consecuencia del evento excitotóxico, ocasiona interrupciones en la cadena transportadora de electrones y un colapso en el potencial de membrana mitocondrial, generando la liberación y acumulación de más electrones en la mitocondria, los cuales pueden reaccionar con el O_2 para producir una concentración mayor de $O_2^{\cdot-}$. Como consecuencia, una parte del $O_2^{\cdot-}$ producido en el espacio intermembranal puede ser transportado al citoplasma mediante canales de aniones dependientes de voltaje (Foster et al., 2006).

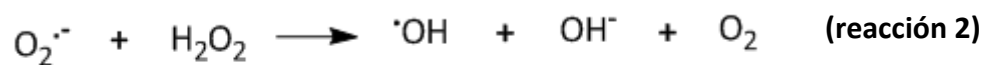
Aunque la mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (MnSOD), que transforma al $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y la glutatión peroxidasa (GPx), que convierte el H_2O_2 en H_2O ; si la concentración de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 en la mitocondria rebasan los límites estimados o si la concentración de las enzimas antioxidantes son insuficientes, el H_2O_2 puede convertirse en OH^{\cdot} en presencia de Fe (reacción de Fenton) (**reacción 1**). El OH^{\cdot} es muy reactivo y su tiempo de vida media es muy corto (10^{-9} s), así que cuando se produce *in vivo*, reacciona cerca del sitio donde se formó.



Reacción de Fenton

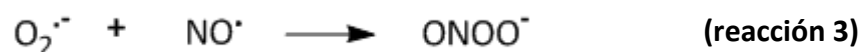
El OH^{\cdot} o bien las ERO generadas ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) pueden dañar la membrana interna mitocondrial y los complejos de la cadena respiratoria, permitiendo la liberación de los grupos prostéticos que catalizarían la reacción de Fenton. Este mecanismo se repetiría varias veces, ya que la cadena respiratoria alterada aumentaría la fuga de electrones, generando más ERO que a su vez dañarían la cadena respiratoria, perpetuando así este fenómeno y desestabilizando el equilibrio energético de la célula, lo que resultaría en la muerte de la misma.

Dentro de la célula, el $O_2^{\cdot-}$ también participa en la reacción de Haber-Weiss (**reacción 2**), que combina una reacción de Fenton con la reducción de Fe^{3+} por el $O_2^{\cdot-}$, para generar OH^{\cdot} (Koppenol, 2001).



Reacción de Haber-Weiss

Alternativamente el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico (NO^{\cdot}) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (**reacción 3**).



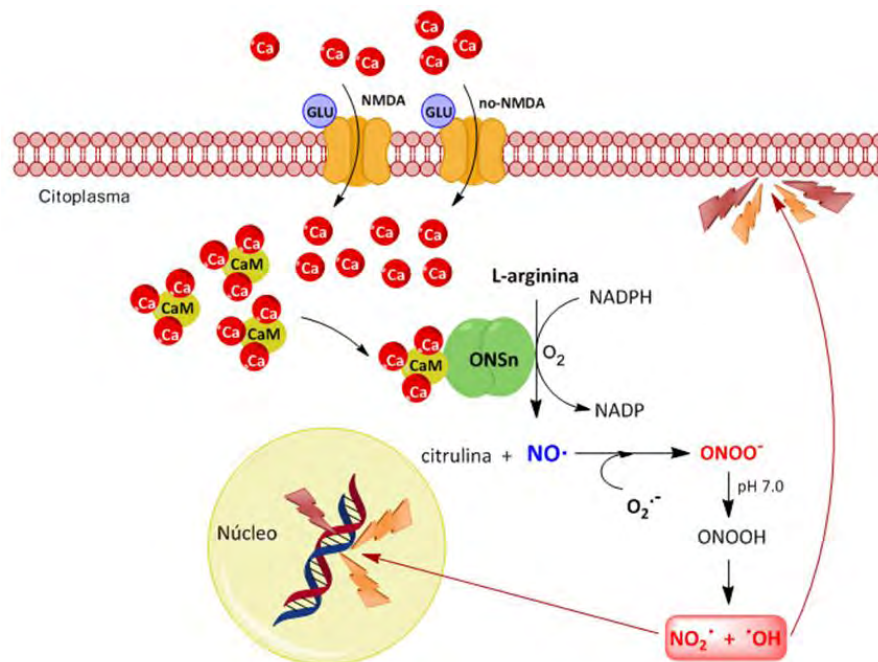
Debido a la amplia distribución de las mitocondrias en el interior de las neuronas (soma, dendritas, axones y particularmente en las terminales sinápticas); el riesgo de una pérdida de electrones es un evento altamente probable, que puede exacerbarse durante el evento excitotóxico.

El aumento de Ca^{2+} intracelular ocasiona la activación de enzimas que están relacionadas con la producción de ERO, como: 1) la óxido nítrico sintasa neuronal (de sus siglas en inglés neuronal Nitric Oxide Synthase, NOSn) que sintetiza NO^\cdot (Sharma et al., 2007) (*ver más adelante*); 2) la fosfolipasa A_2 que puede liberar ácido araquidónico, que al ser metabolizado por lipooxigenasas y ciclooxigenasas produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ como subproducto. Por otra parte, la concentración elevada de Ca^{2+} puede estimular la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que cataliza la oxidación de la hipoxantina en xantina que a su vez es oxidada a ácido úrico. La diferencia entre estas dos enzimas es que la xantina deshidrogenasa cataliza la reacción mediante la reducción del NADP^+ , mientras que la xantina oxidasa necesita reducir al O_2 , generando $\text{O}_2^{\cdot-}$ como producto. La conversión de estas 2 enzimas es irreversible y es generada por proteasas que son activadas por niveles elevados de Ca^{2+} (Harrison, 2002).

1.4.4. Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Las ERN en analogía con las ERO generan un estado de estrés nitrosante cuando se producen de forma excesiva, inhabilitando la capacidad de los sistemas para neutralizarlas y eliminarlas (Klatt & Lamas, 2000). Entre las ERN más importantes está el NO^\cdot y las que derivan del él, como el ONOO^- , entre otras. El NO^\cdot es una pequeña molécula de señalización que actúa en una gran variedad de procesos fisiológicos como: 1) control de la presión sanguínea (vasodilatador); 2) modulando la neurotransmisión del glutamato; o 3) en la respuesta del sistema inmune en la vía fagocítica (Chirino et al., 2006). El NO^\cdot es generado por la enzima NOS, que cataliza la conversión de arginina en citrulina (Sharma et al., 2007). Se han identificado tres subtipos de NOS, dos de ellas son constitutivas (NOSn y la endotelial, NOSe) y la otra es inducible (NOSi). Las tres isoformas están extensamente distribuidas en el cerebro, pero la NOSn y la NOSe están en neuronas y en el endotelio, respectivamente (Nakamura et al., 2007). Todas requieren de calmodulina para su

activación pero sólo la NOSn y NOSe dependen de la concentración de Ca^{2+} , misma que aumenta por la sobreactivación de los receptores NMDA. Estudios han demostrado que altos niveles de NO^\cdot ocasionan una liberación de glutamato de las neuronas, debido a fallas en la función mitocondrial, contribuyendo a la muerte neuronal mediada por excitotoxicidad (McNaught & Brown, 1998). Debido a que el NO^\cdot es soluble tanto en medio acuoso como en medio lipídico, difunde con facilidad a través de las membranas, lo que le da la capacidad de dañar estructuras cercanas aunque su tiempo de vida media sea solo de algunos pocos segundos. Por otra parte, en condiciones de estrés, el NO^\cdot puede reaccionar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado, produciendo cantidades significativas de ONOO^- (**reacción 3**), el cual es un potente agente oxidante que puede causar la fragmentación del ADN y la oxidación de los lípidos (Nakamura et al., 2007). Además, se ha visto que el ONOO^- reduce la recaptura de glutamato en las células gliales, favoreciendo su permanencia en el espacio sináptico. A su vez el NO^\cdot puede llevar a reacciones de nitración de proteínas, dañando su estructura y alterando su funcionamiento, lo que agrava el daño celular (**Esquema 5**).



Esquema 5. Formación del óxido nítrico (NO^\cdot) por la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn), tras la excitación de los receptores NMDA y no-NMDA con glutamato (GLU). El NO^\cdot reacciona con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y genera peroxinitrito (ONOO^-) que a pH fisiológico se protona a ácido peroxinitroso (ONOOH) el cual se descompone en radical dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) y en radical hidroxilo ($^\cdot\text{OH}$), que pueden oxidar lípidos,

proteínas o ácidos nucleicos. Por otra parte, niveles altos de NO^\cdot ocasionan alteraciones en la función mitocondrial, ocasionando liberación de glutamato al espacio sináptico, contribuyendo a la muerte neuronal al sobreactivarse los receptores NMDA.

1.4.6. Daño a macromoléculas por ERO y ERN

Como se mencionó, una gran variedad de ERO y ERN son producidas en el curso del metabolismo normal en los sistemas biológicos y algunos de ellos tienen varias funciones fisiológicas importantes. Sin embargo, su acumulación más allá de las necesidades de la célula pueden potencialmente dañarla de forma irreversible al oxidar directamente macromoléculas como: lípidos (fundamentalmente ácidos poliinsaturados de las membranas), proteínas o ácidos nucleicos (Migliore & Coppede, 2009).

ADN

El OH^\cdot reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando las bases, así como la desoxirribosa. La lesión más estudiada en el ADN es la formación de la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Los continuos incidentes oxidantes generan una modificación permanente del material genético, que representa el primer paso involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento (Valko et al., 2007).

Lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos son extremadamente sensibles a la oxidación (lipoperoxidación). Una vez formado el radical peroxilo (ROO^\cdot), este puede convertirse mediante una reacción de ciclación a endoperóxidos los cuales son precursores de malondialdehído (MDA). El MDA es uno de los dos productos principales que se forman en la lipoperoxidación, junto con el 4-hidroxinonal (4-HNE). El MDA es mutagénico en bacterias y en células de mamíferos y carcinogénico en ratas. El 4-HNE es poco mutagénico pero parece ser el principal producto tóxico de la lipoperoxidación (Valko et al., 2007). Además el 4-HNE puede dañar fácilmente los transportadores de glutamato, entorpeciendo su remoción del espacio sináptico. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, inicia un deterioro constante de las funciones membranales y provoca una disminución en la fluidez, reducción en el potencial

electroquímico y un aumento en la permeabilidad de la membrana, dañando su integridad (Dorado-Martínez et al., 2003).

Proteínas

La oxidación causa alteraciones en la estructura de algunas proteínas y la formación de agregados proteínicos. Estas proteínas anormales inducen daño oxidante y están presentes en las enfermedades neurodegenerativas (**Tabla 3**). La producción de radicales libres ocasiona modificaciones en las proteínas que pueden conducirla a su rápida degradación. Entre las oxidaciones que sufren los aminoácidos de las proteínas se encuentran la formación de grupos carbonilo que es un marcador temprano del daño oxidante a las proteínas (Reznick & Packer, 1994).

Tabla 3. Relación entre la proteína alterada, la lesión fisiopatológica y la enfermedad neurodegenerativa asociada.

Proteína alterada	Productos	Enfermedad Neurodegenerativa
β -Amiloide	Placas neuríticas	Enfermedad de Alzheimer
Proteína tau	Maraña neurofibrilar	
Huntingtina	Inclusiones nucleares	Enfermedad de Huntington
α -Sinucleína	Cuerpo de Lewy	Enfermedad de Parkinson
Cu-Zn-SOD	Agregados proteicos	Esclerosis Lateral Amiotrófica

(Dorado-Martínez et al., 2003).

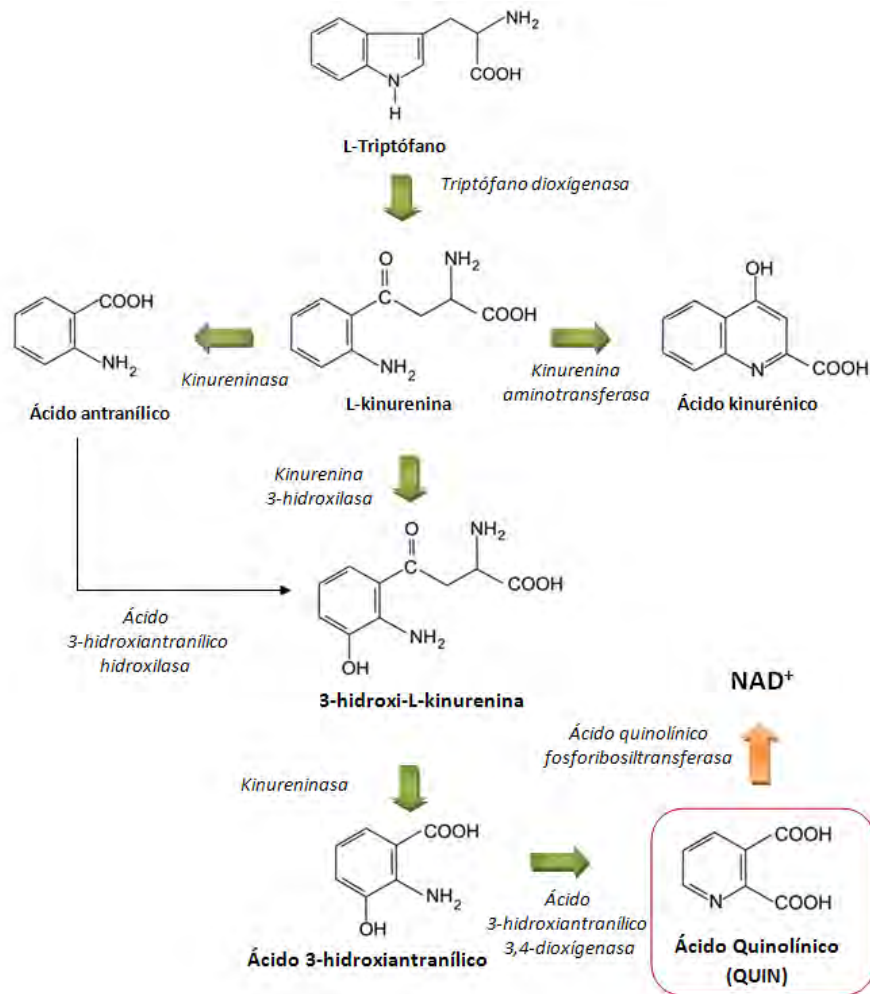
1.4.7. El cerebro está en desventaja ante el estrés oxidante

En la actualidad se reconoce que tanto el estrés oxidante como el nitrosante juegan un papel que acompaña el desarrollo del deterioro neuronal en las enfermedades neurodegenerativas (Migliore & Coppédé, 2009). El cerebro es particularmente vulnerable a este tipo de daño debido a: **1)** su alto consumo de O_2 ; **2)** su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados; **3)** su limitada actividad antioxidante (poca y moderada actividad de catalasa, SOD y GPx); y **4)** la presencia de Fe^{2+} y Cu^{2+} en algunas regiones, que propician las reacciones de Fenton y Haber Weiss.

Debido a esto, se hacen numerosos esfuerzos en la actualidad para poder combatir el desafío oxidante que se lleva a cabo en este tipo de neuropatologías y en el proceso de envejecimiento normal.

1.5. Ácido quinolínico (QUIN)

Varias patologías del Sistema Nervioso Central (SNC) son acompañadas por alteraciones en el metabolismo del triptófano, cuya causa se ha asociado a la generación de metabolitos neuroactivos (Vécsei et al., 2013). La vía de la kinurenina es la principal ruta metabólica del L-triptófano en la mayoría de los tejidos de mamíferos, incluyendo el cerebro. Esta vía es responsable de la producción de NAD^+ y NADP^+ , los cuales participan en múltiples procesos metabólicos (Braidy et al., 2009). En esta vía se forman varias moléculas neuroactivas siendo el ácido quinolínico (ácido-2,3-piridin dicarboxílico; QUIN) el más importante en términos de actividad biológica (Zádori et al., 2009) (**Esquema 6**).



Esquema 6. Principales componentes de la Vía de la kinurenina.

El QUIN es una potente excitotoxina, cuyo efecto tóxico está relacionado con la activación selectiva de los receptores NMDA y con la producción de ERO y ERN. El QUIN es un agonista competitivo endógeno de los receptores NMDA y actúa específicamente en los subgrupos que contienen las subunidades NR2A y NR2B (Ting et al., 2009).

El efecto tóxico del QUIN se asocia con su concentración en las diferentes áreas del cerebro y por la susceptibilidad intrínseca de las diferentes poblaciones de neuronas a él. La concentración de QUIN varía dependiendo de la región cerebral, siendo la corteza cerebral donde se observan los niveles más altos y en el estriado los más bajos. Además, los niveles aumentan en el envejecimiento (Moroni et al., 1984). Por otra parte, las áreas neuronales con mayor densidad de receptores NMDA con subunidades NR2B, tales como

las neuronas espinosas medianas en el estriado, parecen ser más susceptibles al efecto excitotóxicos del QUIN. Lo cual apoya la hipótesis de que la muerte de las neuronas estriatales depende de los aminoácidos excitadores (Li et al., 2003).

1.5.1. Mecanismo de acción del QUIN

Como se mencionó, la analogía estructural del QUIN con el NMDA le confiere la capacidad de actuar de manera selectiva sobre los receptores NMDA (Garthwaite & Garthwaite, 1987; Stone et al., 2000). La administración de antagonistas selectivos de los receptores NMDA tales como el ácido 2-aminofosfonoheptanóico (Foster et al., 1984), el ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico (Garthwaite & Garthwaite, 1987) o el MK-801 (Santamaría & Ríos, 1993), disminuyen el daño neuronal ocasionado por el QUIN, sugiriendo la participación del receptor. También se ha observado que el QUIN puede estimular la lipoperoxidación a tiempo cortos (30 min) (Ríos & Santamaría, 1991). A su vez, la inducción de la lipoperoxidación es un evento temprano asociado a la producción de ONOO⁻ por el QUIN. (Pérez-De la Cruz et al., 2005). De acuerdo a lo anterior, las lesiones inducidas por el QUIN son atenuadas por el tratamiento con agentes que favorecen la descomposición del peroxinitrito (González-Cortés et al., 2008) o con atrapadores de ERO (Nakao et al., 1996). También se ha visto que tras la administración de QUIN, se incrementa la formación de O₂⁻ (Maldonado et al., 2010) y de [•]OH (Santamaría et al., 2001) en las primeras horas, sugiriendo que estos radicales contribuyen al patrón de toxicidad inducido por el QUIN. Estos mecanismos pueden explicar cómo el QUIN ejerce su notable potencia neurotóxica mediante la producción de ERO y ERN.

Se ha visto que la producción excesiva de ERO y ERN está relacionada con la muerte celular por necrosis (Syntichaki & Tavernarakis, 2003), involucrando cambios metabólicos progresivos con una producción de ATP defectuosa, mismos que se potencian por el desequilibrio en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Esta pérdida de la regulación energética impide un buen funcionamiento de las bombas plasmáticas permitiendo la entrada masiva de Na⁺ y Cl⁻ con la subsecuente entrada de H₂O lo que genera un hinchamiento celular irreversible. El aumento en la concentración de Ca²⁺ libre, también

activa enzimas líticas que provocan daño a nivel de proteínas, lípidos y DNA, pero además induce la activación de enzimas relacionadas a la producción de más ERO y ERN como la NOS (Aguilera et al., 2007) y la NADPH oxidasa (Maldonado et al., 2010) entre otras. Por otra parte el Ca^{2+} participa en la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, manteniendo el proceso excitotóxico por un tiempo prolongado. Esta muerte celular repentina causa la activación de procesos apoptóticos en células vecinas, así que los efectos tóxicos del QUIN involucran ambos tipos de muerte neuronal: necrosis (Maldonado et al., 2007) y apoptosis (Nicotera & Lipton, 1999).

1.5.2. El QUIN en la neurodegeneración estriatal

Se ha encontrado un incremento en la concentración de QUIN en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con enfermedades neurológicas e infecciosas como la encefalopatía hepática, e infecciones cerebrales por VIH (Stone, 2001). El análisis *post mortem* en cerebros de pacientes con la enfermedad de Huntington en etapas tempranas, revela un incremento en el nivel de QUIN (Guidetti, 2004). Además, se ha observado un incremento en la actividad de la ácido 3-hidroxiantranílico-3,4-dioxigenasa que cataliza la conversión de ácido 3-hidroxiantranílico en QUIN (Schwarcz et al., 1988). Por otro parte, se han observado que alteraciones en el metabolismo de la vía de la kinurenina están relacionadas con la patogénesis de diversas enfermedades cerebrales, tales como la Enfermedad de Huntington, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer y Esclerosis Lateral Amiotrófica (Tan et al., 2012).

Dada la evidencia que relaciona al QUIN con la neurodegeneración, su administración intraestriatal se ha utilizado como modelo experimental para estudiar la muerte neuronal en el estriado.

1.6. Antioxidantes

Ante todas estas fuentes de especies oxidantes, la célula posee una serie de mecanismos de defensa para neutralizar la excesiva producción de ERO y ERN (Coyle & Puttfarcken, 1993). Existen los sistemas antioxidantes endógenos de tipo enzimático y no-enzimático,

dentro de los primeros están: las superóxido dismutasas (Cu-ZnSOD y MnSOD), las catalasas (CAT) y las peroxidases como la glutatión peroxidasa (GPx) y la tiorredoxina peroxidasa entre otras. Dentro de los sistemas antioxidantes no-enzimáticos, destacan: la vitamina A, el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), el ácido úrico, aminoácidos como la glicina y la taurina, y el tripéptido glutatión (GSH), a los que se denominan atrapadores (*scavengers*) de radicales libres (Coyle & Puttfarcken, 1993). En los últimos años, se ha encontrado que ciertos compuestos de origen natural presentan propiedades antioxidantes, tales como los fitoquímicos. Dentro de estos compuestos encontramos algunos polifenoles, flavonoides e isotiocianatos (**Tabla 4**). En este trabajo revisaremos las propiedades de la curcumina (CUR) como antioxidante.

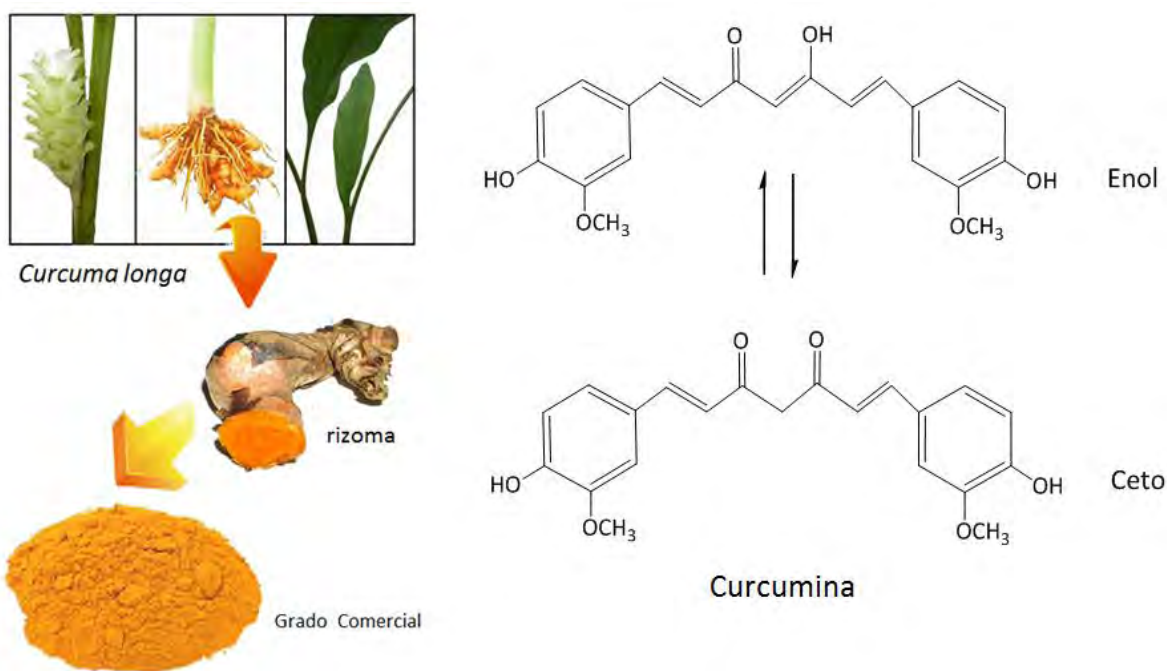
Tabla 4. Antioxidantes de origen natural

Compuestos		Fuente	Referencia
Isotiocianatos	Sulforafano	Vegetales crucíferos	Mizuno et al., 2011
Polifenoles			
No-flavonoides	Curcumina	<i>Curcuma Longa</i>	Carmona-Ramírez et al., 2013
	Resveratrol	Uvas	Ren et al., 2011
Flavonoides	Quercetina	Frutas y vegetales	Granado-Serrano et al., 2012
Catecoles	Carnosol	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Martin et al., 2004

1.7. Curcumina (CUR)

La CUR es un compuesto derivado del rizoma de la hierba *Curcuma longa* (**Esquema 7**) que pertenece a la familia *Zingiberaceae*, la cual es cultivada principalmente en la India y en otros países del Sur de Asia (Epstein et al., 2010). La CUR es el principal constituyente del condimento asiático llamado turmerica (cúrcuma), principal componente del curry, y que ha sido conocido en la medicina ayurvédica desde hace milenios como remedio para muchos padecimientos, como son inflamaciones, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Jurenka, 2009). Entre otros componentes que forman parte de la turmerica, están los curcuminoides que son análogos de la CUR; la demetoxicurcumina y la desmetoxicurcumina, los cuales si bien presentan actividad biológica, ésta es menor comparada a la de la CUR (Ahmad et al., 2013). La CUR está disponible comercialmente como un extracto del rizoma *Curcuma spp.*, cuyo contenido está estimado de la siguiente

manera: 77% de CUR, 17% de demetoxycurcumina y 6% bisdemetoxicurcumina. La CUR es usada también como colorante natural (Amarillo Natural #3) asignado como E100, cuando es aplicado como un agente colorante para alimentos (Grynkiewicz & Slifski, 2012). La CUR es prácticamente insoluble en agua y su solubilidad es principalmente en solvente orgánicos, tales como el DMSO y el etanol. Por otra parte, se han utilizado emulsiones de CUR con carboximetilcelulosa (un aditivo para modificar la viscosidad) para su uso en las administraciones orales (Ung et al., 2010).



Esquema 7. *Curcuma longa*. Estructura de la curcumina y su tautomerismo ceto-enol.

La CUR ha sido utilizada en una gran variedad de aplicaciones farmacéuticas, incluyendo el uso como agente antiinflamatorio (Holt et al., 2005) y como tratamiento para la diabetes (Arun & Nalini, 2002). Se han demostrado sus propiedades quimioprotectoras, al presentar efectos benéficos en varias líneas celulares de cáncer (Shehzad et al., 2013) y está bien establecida su capacidad para actuar como un antioxidante directo e indirecto, reduciendo el daño generado por el estrés oxidante en modelos de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Ringman et al., 2005), en las cuales el estrés oxidante es un evento importante.

1.7.1. Propiedades estructurales de la CUR: propiedades antioxidantes

La CUR, [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] comúnmente llamada diferuloilmetano, es un polifenol hidrofóbico de bajo peso molecular. Estructuralmente es una β -dicetona bis- α,β -insaturada, la cual exhibe un tautomerismo ceto-enol (**Esquema 7**). La forma ceto es predominante en medio ácido, en soluciones neutras y en la membrana celular. A pH 3-7 la CUR es estable, y actúa extraordinariamente como un potente donador de protones. En contraste, en medio alcalino (arriba de pH 8) es menos estable, y predomina la forma enol de la cadena heptadienona. En esta forma el enlace -O-H formado, actúa como un moderado donador de electrones (Anand et al., 2007). Sin embargo, los grupos hidroxilo en la posición *orto* de los anillos aromáticos, son los grupos principales O-H con esa propiedad. El grupo metileno entre la fracción β -diacetona de la cadena heptadienona, contiene un átomo de carbono altamente activado y los enlaces C-H en este carbono son muy débiles debido a la deslocalización del electrón desapareado en los oxígenos adyacentes (Jovanovic et al., 1999). Estas características estructurales de la CUR le confieren a la molécula un mecanismo más completo como “atrapador” respecto a otros antioxidantes fenólicos (Barzegar & Moosavi-Movahedi, 2011).

Por otra parte, la presencia de estos dos elementos estructurales son requeridos para su alta capacidad de actuar como antioxidante indirecto, mismo que está relacionado con su capacidad de inducir la activación de la vía Nrf2/ARE (Dinkova-Kostova & Talalay, 1999).

1.8. Vía Nrf2/ARE

El factor de transcripción Nrf2 (Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2) es el regulador maestro de la homeostasis redox en la célula, ya que controla de forma basal e inducible, la expresión de una amplia gama de genes citoprotectores, que le confieren a la célula la protección necesaria ante los retos oxidantes, a los cuales está sujeta en condiciones fisiológicas y patológicas.

El sitio de unión en el ADN de Nrf2 se conoce como ARE (Elementos de Respuesta Antioxidante, 5'-GTACnnnGC-3'), es una secuencia “cis-acting” presente en la región

promotora de un amplio grupo de genes, que codifican para proteínas involucradas en una gran variedad de reacciones antioxidantes y de desintoxicación, denominadas como enzimas de fase II (*Ver más adelante*) (Copple et al., 2008).

1.8.1. Regulación de la vía Nrf2/ARE

Nrf2 pertenece a una familia de proteínas básicas con un característico “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal, misma que es responsable de su unión al ADN (Niture et al., 2010). Nrf2 bajo condiciones basales se encuentra unido (secuestrado) a la proteína Keap1 (proteína 1 asociada-ECH Kelch-like) reprimiendo su actividad y formando un complejo Nrf2-Keap1 en el citoplasma mediante interacciones con la actina del citoesqueleto (Copple et al., 2008). La proteína Keap1 es un dímero que funciona como una molécula sensor en la respuesta al estrés oxidante, liberando al Nrf2. En ausencia de estrés, Keap1 funciona como adaptador de las enzimas que se encargan de la ubiquitinación (Culina-3, Cul3 y Rbx1) del Nrf2 para su degradación proteosomal, previniendo la expresión innecesaria de genes antioxidantes (Kobayashi et al., 2006).

En presencia de agentes oxidantes y/o electrófilos, se perturba la unión entre los dominios de repeticiones de doble glicina (DGR) de Keap1 y el dominio Neh2 de Nrf2, debido a que éstos pueden oxidar los grupos sulfhidrilos de las cisteínas que están en la región de intervención (IVR) de Keap1, e inducir la fosforilación del Nrf2, promoviendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (Copple et al., 2008). Todos estos eventos culminan en la eventual translocación de Nrf2 al núcleo, donde forma heterodímeros con proteínas Maf (grandes o pequeñas), facilitando su interacción con el sitio promotor específico del ADN.

La proteína Keap1 tiene 25 residuos de cisteína distribuidos en sus distintos dominios, de los cuales 9 se caracterizan por tener grupos sulfhidrilo más expuestos, lo que los hace altamente reactivos. Se ha propuesto a estos residuos de cisteína, como la principal vía para inducir la activación de Nrf2 (Tkachev et al., 2011). Estudios previos, han hecho una clasificación de compuestos que actúan como inductores de Nrf2, en base a los residuos de cisteína en los que actúan (Zhang et al., 2013). La CUR por su parte, al presentar

características como aceptor de la reacción de Michael, está clasificada en la clase II, sugiriendo que actúa en los residuos C151, C273 y/o C288 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Clasificación de inductores de Nrf2

Clase	I	II	III	IV
Dominio de keap1	BTB	IVR	DGR	IVR, DGR
Residuo de aminoácido	C151	C273, C288	Y334, S363, N382	C266
Molécula (características químicas)	Sulforafano tBHQ D3T, DEM	Curcumina PGA2 Acroleína	Proteínas (p62, p21)	Metales pesados (Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , As ²⁺)
Mecanismo	Unión al sitio Cul3 Liberación de keap1	Liberación de keap1	Liberación de keap1	Desconocido

Donde tBHQ: t-butilhidroquinona; D3T: 1,2-ditiol-3-tion; DEM: dietilmaleato; PGA2: prostaglandina A2. Modificada de Zhang et al., 2013.

1.8.2. Enzimas de Fase II

Las proteínas de fase II catalizan diversas reacciones que colectivamente le confieren protección a la célula contra el daño continuo que las especies oxidantes y/o electrófilos inducen. Más de 600 genes poseen la secuencia ARE en su región promotora. Dentro de los cuales se encuentran enzimas y proteínas relacionadas directamente con un efecto antioxidante y que pueden dividirse en tres grupos: i) las proteínas relacionadas con la homeostasis del glutatión (GSH), ii) proteínas involucradas en la desintoxicación de peróxidos y en la homeostasis del hierro, y iii) proteínas relacionadas en la homeostasis del NADPH (Lee et al., 2003).

1.9. Glutatión (GSH)

Es un tripéptido (glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly)) de bajo peso molecular que se encuentra en altas concentraciones en todas las células. Es uno de los tioles no proteínicos más estudiados a nivel intracelular debido a que está involucrado en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos. Particularmente en el cerebro, el GSH es considerado como el principal antioxidante al encontrarse en una concentración de 2-3 mM, la cual es mucho más alta que en el LCR (Dringen, 2000). Se han asociado deficiencias en la homeostasis del GSH en el cerebro con enfermedades cerebrales tales como la

Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica y la Ataxia de Friedreich (Aoyama et al., 2008).

1.9.1. Funciones neuroprotectoras del GSH

El GSH ejerce sus funciones a través de varios mecanismos:

- I. Actúa como “scavenger” (atrapador) de radicales libres, particularmente efectivo contra el $O_2^{\cdot-}$ y el $\cdot OH$, para este último no existen defensas enzimáticas endógenas. Esta habilidad del GSH le proporciona a la neurona una efectiva y primera línea de defensa antioxidante contra las ERO más reactivas y comunes durante los desafíos excitotóxicos (Bains & Shaw, 1997).
- II. Funciona como sustrato de algunas enzimas (GPx) en la reducción del H_2O_2 u otros peróxidos. En el cerebro los niveles de GPx son relativamente elevados, en comparación con los de la catalasa que también metaboliza H_2O_2 .
- III. Reacciona con varios compuestos endógenos y xenobióticos mediante la GST para formar conjugados-S-glutatión, los cuales son exportados al exterior de la célula (Commandeur et al., 1995). Por ejemplo el GSH puede reaccionar con el 4-HNE para formar aductos GSH-4-HNE. Este proceso es de gran importancia en la detoxificación celular (Xie et al., 1998).
- IV. Sirve como almacén y transportador de cisteína. La cisteína por si misma tiene efectos neurotóxicos mediante la producción de radicales libres, incrementando el glutamato extracelular y conduciendo a la sobreactivación de los receptores NMDA (Janáky et al., 2000).
- V. Es el principal amortiguador redox, ya que mantiene el estatus de los tioles proteínicos esenciales. El GSH puede conducir a la formación reversible del enlace disulfuro entre los grupos tiol de las proteínas (S-glutationilación). Este proceso es crítico en la prevención de la oxidación irreversible de las proteínas. En otras palabras protege a los grupos sulfhidrilo de las proteínas contra los ataques oxidantes de los radicales libres (Giustarini et al., 2004).
- VI. Puede actuar como neurotransmisor/neuromodulador, ya que la fracción γ -glutamil del GSH se une a los receptores NMDA, ejerciendo acciones duales

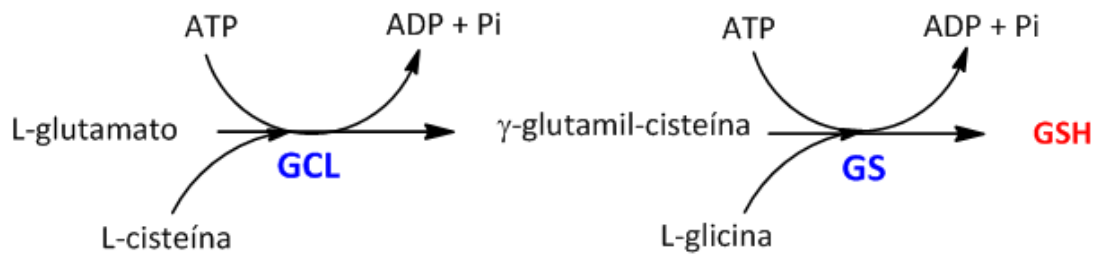
(antagonista/agonista) sobre la respuesta neuronal mediada por los receptores NMDA en el cerebro.

Dada la gran variedad de funciones que desempeña el GSH en la fisiología celular, los cambios en su homeostasis han sido implicados en la etiología de varias enfermedades degenerativas tales como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica y la Ataxia de Friedreich (Schulz et al., 2000).

1.9.2. Síntesis de glutatión

La síntesis del GSH en el cerebro, la llevan a cabo en los astrocitos y las neuronas. La tasa de síntesis del GSH se limita a la actividad de la γ -GCL y a la disponibilidad de la cisteína (Cys). Su síntesis ocurre en el citosol y comprende dos pasos enzimáticos que dependen de ATP. El primer paso es limitante y está catalizado por la enzima γ -glutamina-L-cisteín ligasa (γ -GCL), que depende de Mg^{2+} o Mn^{2+} . Esta enzima está formada por dos subunidades; una cadena pesada (~73 KDa) y una cadena ligera (~31 KDa), que son codificadas por diferentes genes tanto en el humano como en la rata. La cadena pesada tiene la actividad catalítica (γ -GCLc) y puede inhibirse por retroalimentación con GSH, mientras que la cadena ligera contribuye a la regulación de la cadena pesada. La γ -GCL une el L-glutamato (Glu) con la L-cisteína (Cys) para formar el dipéptido γ -glutamilcisteína (γ -GluCys), este paso es regulado por la disponibilidad de la Cys, lo cual es un factor crítico durante la síntesis del GSH (Aoyama et al., 2008).

El segundo paso es catalizado por la glutatión sintetasa (GS), que une la L-glicina (Gly) al dipéptido formado, para producir el GSH (**Esquema 8**). Éste paso no se inhibe por retroalimentación con el GSH (Dringen, 2000).



Esquema 8. Síntesis de GSH. La γ -glutamina-L-cistein ligasa (γ -GCL) forma el dipéptido γ -glutamil-cisteína, para que después la glutatión sintetasa (GS) adicione L-glicina para formar el GSH.

En la neurona la mayoría de la Cys utilizada en la síntesis de GSH es importada del espacio extracelular (90%), mediante el transportador de aminoácidos excitadores EAAC1. Mientras que los astrocitos utilizan el transportador cistina/glutamato (Xc^-) para capturar cistina (forma oxidada de la cisteína) y así, reducirla nuevamente e incrementar los niveles de cisteína intracelular para la síntesis de GSH.

El GSH sintetizado por los astrocitos es liberado al espacio extracelular, y es escindido por la γ -glutamiltanspeptidasa (GGT), dejando el glutamato libre (Glu) y el bipéptido cisteín-glicina (CysGly). Este dipéptido CysGly, puede ser recapturado principalmente por astrocitos o por las neuronas, o puede ser cortado en Cys y Gly por acción de la aminopeptidasa N (ApN). La Cys libre puede ser capturada y utilizada para la síntesis de GSH en la neurona, o ser oxidada a cistina en el espacio extracelular para ser recapturada y utilizada para la síntesis de GSH en el astrocito (ver **Esquema 9**).

1.9.3. Enzimas de Fase II involucradas a la homeostasis del GSH

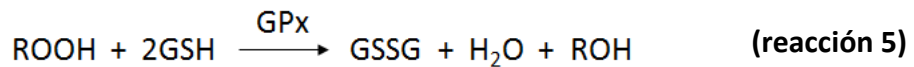
Los niveles de GSH en las células pueden ser modulados como se mencionó en la sección anterior, por las enzimas encargadas de su síntesis, la γ -GCL y la GS. Sin embargo, existen otro conjunto de enzimas que contribuyen a mantener los niveles óptimos de GSH, al regular el radio GSH:GSSG en la célula, como se revisará a continuación.

Glutación peroxidasa (GPx): es una selenoproteína, de la cual existen varias isoformas: citosólica, plasmática y de fosfolípidos. Esta enzima cataliza la reducción del H_2O_2 ,

empleando dos moléculas de GSH. Los productos de la reacción son el glutatión oxidado (GSSG) y el H₂O (Brigelius-Flohé, 1990) (**reacción 4**).



La GPx también cataliza la reducción dependiente del GSH de los hidroperóxidos de los ácidos grasos; en todos los casos, el grupo peróxido (ROOH) es reducido a un alcohol (ROH) (**reacción 5**):



Glutati3n reductasa (GR): es una flavoproteína que se encuentra en el citoplasma y posee en su sitio activo FAD. Cataliza la reducción del GSSG, empleando NADPH como fuente de electrones (**reacción 6**) y se encarga de restablecer los niveles de GSH.



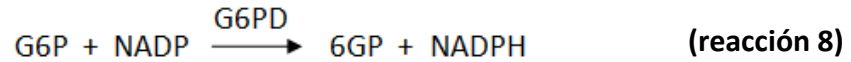
Glutati3n S-transferasa (GSTs): Son una familia de proteínas solubles y su funci3n primaria es catalizar la conjugaci3n de GSH con una gran variedad de compuestos orgánicos (RX) (**reacci3n 7**) (Ruzza et al., 2009). Los metabolitos despu3s de la conjugaci3n con el GSH son m3s hidrofílicos y por lo tanto biológicamente inactivos, adem3s son f3cilmente excretados en la orina (Basten et al., 2002).



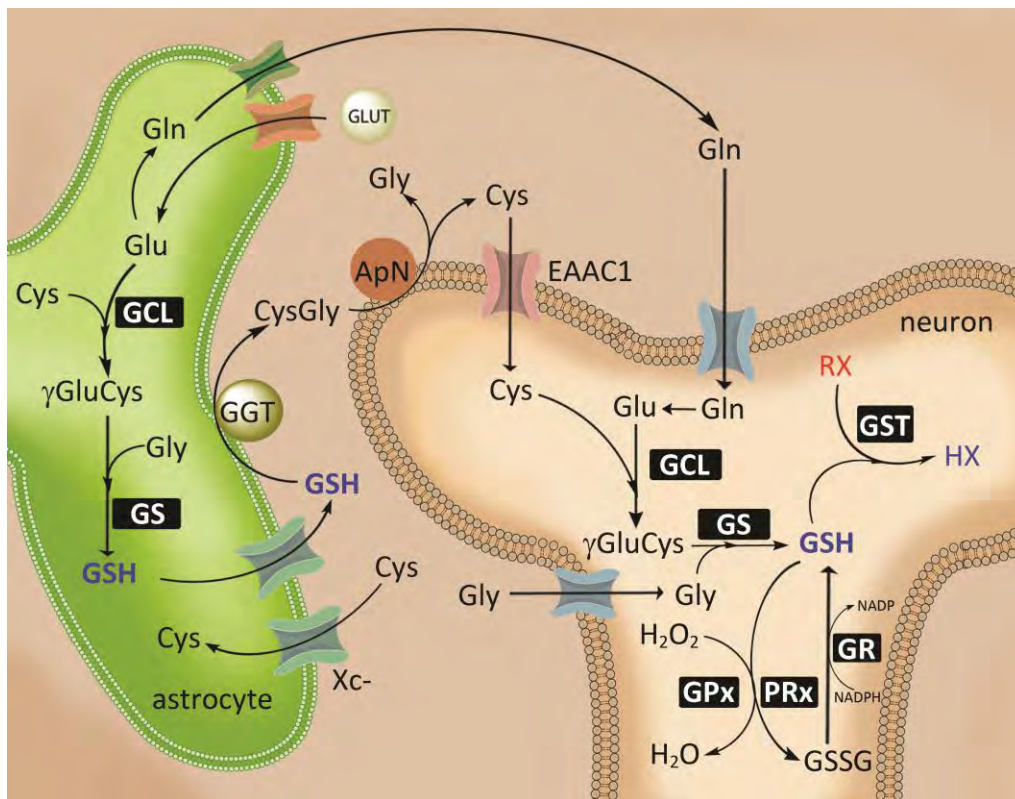
Las GSTs tambi3n pueden reducir muchos hidroperóxidos por medio de una acci3n peroxidasa independiente de selenio y detoxificar algunos productos de la peroxidaci3n de lípidos como el 4-HNE (Talalay, 2000).

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD): Esta enzima es clave y limitante en la regulaci3n de la vía de las pentosas, encargada de la degradaci3n de la glucosa. Cataliza la oxidaci3n irreversible de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (6PG) en una

reacción dependiente de NADP^+ como coenzima (**reacción 8**). Un producto muy importante derivado de la acción de esta enzima es el NADPH , un agente reductor utilizado en muchas reacciones biológicas.



En el siguiente esquema se muestran algunas enzimas de fase II relacionadas a la homeostasis del GSH, cuya expresión depende de la actividad de Nrf2 (**Esquema 9**).



Esquema 9. Enzimas de fase II relacionadas a la homeostasis de GSH (cuadros negros). GCL; γ -glutamina-L-cisteín- ligasa, GS; glutatión sintetasa, GST; glutatión S-transferasa, GPx; glutatión peroxidasa, GR; glutatión reductasa, PRx; peroxiredoxina, GGT; γ -glutamiltranspeptidasa, ApN; aminopeptidasa N, EAAC1; transportador de aminoácidos excitadores, Cys; cisteína, Gly; glicina, Glu; glutamato, Gln; glutamina, GLUT; glutamato; Xc⁻; transportador cistina/glutamato, y GSSG; glutatión oxidado. (Modificado de Silva-Islas et al., 2012).

2. ANTECEDENTES

La capacidad de algunos compuestos de origen natural (tales como polifenoles, isotiocianatos y flavonoides) para prevenir los eventos bioquímicos, morfológicos y conductuales que se presentan en el curso de las enfermedades neurodegenerativas, ha quedado en manifiesto en numerosos estudios hechos en modelos *in vivo* e *in vitro* (Braidy et al., 2010; Basli et al., 2012). En una investigación previa del laboratorio se encontró que la CUR tiene la capacidad de prevenir las alteraciones inducidas por el QUIN, cuando se administra una dosis de 400 mg/kg *i.g.* durante 10 días previos a la infusión de la neurotoxina. El efecto protector de la CUR se asoció a su capacidad de activar el factor Nrf2 y al incremento en la actividad de algunas enzimas reguladas por Nrf2 (Carmona-Ramírez et al., 2013). En este trabajo se concluyó que la CUR es eficaz como tratamiento preventivo ante el evento excitotóxico inducido con el QUIN.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevención de la aparición de los síntomas en las patologías cerebrales representa una gran oportunidad para anticiparse a los eventos que propician la degeneración neuronal, por lo que se han probado una gran cantidad de compuestos de origen natural, en la prevención de este proceso. Sin embargo, hacen falta acciones terapéuticas que logren detener el avance sintomático de este proceso. A la fecha no existen acciones terapéuticas que logren erradicar el problema de la degeneración neuronal y los tratamientos son solo paliativos. Además, los tratamientos probados en modelos animales hasta ahora son de carácter profiláctico, pero debido al carácter idiopático impredecible en la cual se presentan los padecimientos neurodegenerativos resultan prácticamente ineficientes. Ante esta disyuntiva, para emular una situación, en la cual el daño neuronal ha iniciado antes de recibir algún tipo de tratamiento, en este trabajo, se evaluó el efecto post-lesión de la CUR sobre las alteraciones motoras, histológicas y bioquímicas inducidas con el QUIN en el estriado de rata y se propuso un posible mecanismo por el cual se ejerce dicho efecto, sugiriendo así a la CUR como una posible herramienta terapéutica contra este tipo de enfermedades.

4. HIPÓTESIS

La degeneración de las células del estriado de rata, inducida con el QUIN, disminuirá con la administración crónica post-lesión de la CUR, al actuar como antioxidante indirecto.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto terapéutico de la CUR sobre las alteraciones motoras, morfológicas y bioquímicas que se inducen con el modelo experimental con la administración de ácido quinolínico en ratas.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la administración crónica de CUR sobre los cambios en la ejecución motora (número de contactos a la pared del cilindro con ambas extremidades delanteras (anteriores) y con la extremidad delantera ipsilateral al daño), a los días 3 y 6 posteriores a la infusión intraestriatal con QUIN.
- Evaluar el efecto de la CUR sobre la conducta de rotación inducida con la administración de la apomorfina al día 6 después de la infusión intraestriatal con QUIN.
- Determinar el efecto de la CUR sobre los niveles de Nrf2 en fracciones nucleares de estriado de rata, 7 días después de la infusión intraestriatal con QUIN.
- Determinar el efecto de la CUR sobre los niveles de GSH en estriado de rata, 7 días después de la infusión intraestriatal con QUIN.
- Determinar el efecto de la CUR sobre la modulación en la expresión y actividad de algunas enzimas involucradas con el mantenimiento de los niveles de GSH en estriado de rata, a los 7 días de la infusión intraestriatal con QUIN.

6. METODOLOGÍA

6.1. Reactivos

El ácido quinolínico (QUIN), la curcumina (CUR), la apomorfina, el o-ftaldehído (OPA), la *N*-etilmaleinida (NEM), el HEPES, el β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), el β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), la glutatión reductasa, el glutatión reducido (GSH), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el glutatión oxidado (GSSG), el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), la glucosa 6-fosfato, el ditiotreitól (DTT), el Nonidet P-40, la albumina sérica bovina (ASB), el fluoruro de metil fenilsulfonio (PMSF) y los inhibidores de proteasas y fosfatasas, se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂*6H₂O) y el ácido fosfórico (HPO₃) se obtuvieron de Golden Bell Reactivo (Guadalajara, Jal., México). El Fluoro-Jade B (FJ-B) y la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se obtuvieron de Millipore (Bedford, MA, USA). Los anticuerpos anti-GPx, anti-GR, anti-γGCLc y anti-Nrf2 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, USA). En anticuerpo Anti-PCNA se obtuvieron de Abcam (Cambridge, MA, USA). Los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón se obtuvieron de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA). El formaldehído se obtuvo de J.T. Baker (Ciudad de México, México). Todos los demás reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas. Se utilizó agua desionizada obtenida con un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA) para preparar las soluciones.

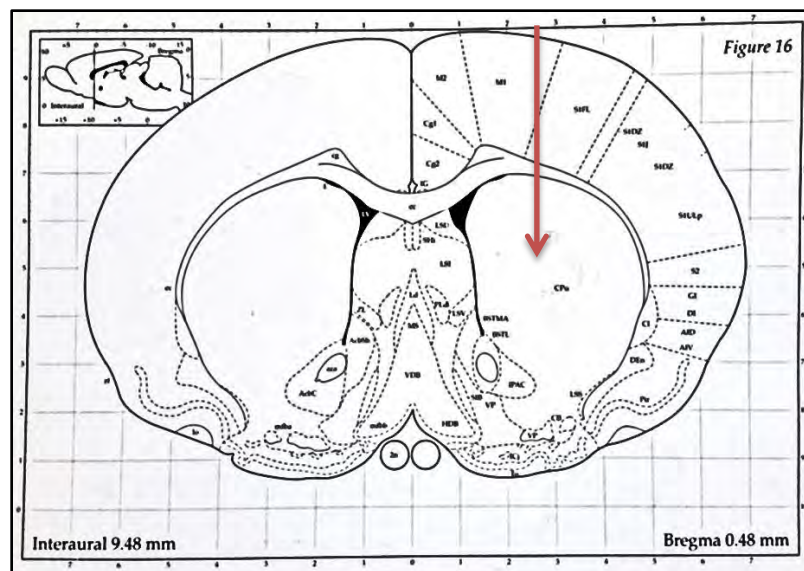
6.2. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 2-3 meses de edad, con un peso de entre 270-320 g, Todos los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura (25.8 ± 3°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., Richmon, IN, EEUU) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los animales se llevaron a cabo de acuerdo a las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los

Institutos Nacionales de Salud. 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 de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

6.3. Lesión intraestriatal

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). El QUIN fue disuelto en solución salina y se ajustó el pH a 7.4 utilizando NaOH. Los animales recibieron una inyección unilateral con una micro-jeringa Hamilton (con capacidad de 10 μ l) en el estriado derecho, de acuerdo a las siguientes coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y -4.5 mm ventral a la dura (**Esquema 10**) (Paxinos & Watson, 1998). Se inyectó 0.25 μ l de QUIN cada 0.5 min, hasta completar 1 μ l de QUIN (equivalente a 240 nmol) como volumen final. Posteriormente se esperó 2 min para retirar cuidadosamente la jeringa. Los animales de los grupos SHAM y CUR recibieron 1 μ l de solución salina, siguiendo el mismo procedimiento descrito.



Esquema 10. Corte coronal de cerebro de ratona a una profundidad de 0.48 mm anterior al bregma. La flecha roja indica el sitio de infusión de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas; 0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y -4.5 mm ventral a la dura.

6.4. Diseño experimental

Los animales se dividieron al azar en 4 grupos (n=5):

- I. Grupo SHAM, se les administró a las ratas solución salina (intraestriatal) y carboximetilcelulosa (i.g.).
- II. Grupo QUIN, se les administró a las ratas QUIN (intraestriatal) y carboximetilcelulosa (i.g.).
- III. Grupo CUR, se les administró a las ratas solución salina (intraestriatal) y CUR (i.g.).
- IV. Grupo QUIN+CUR, se les administró a las ratas QUIN (intraestriatal) y CUR (i.g.).

Los grupos QUIN y QUIN+CUR recibieron 1 μ l de QUIN (equivalente a 240 nmol). Los grupos CUR y QUIN+CUR recibieron 6 dosis de CUR (400 mg/Kg), iniciando 24 h después de la infusión intraestriatal con QUIN o solución salina, durante 6 días consecutivos (dosis establecida en estudios previos en el laboratorio) (Carmona-Ramírez et al., 2013). Veinticuatro horas después de la última dosis de CUR (día 7) se sacrificaron los animales, y dependiendo del análisis se obtuvo el cerebro total o el estriado inyectado.

6.5. Valoración motora

6.5.1. Prueba de simetría motora

La prueba se realizó un día antes de la lesión, y a los 2 y 6 días después de la lesión intraestriatal, siempre a las 10:00 pm. Las ratas fueron colocadas durante 5 min en un cilindro de acrílico transparente (30 cm de alto por 20 cm de diámetro). Durante ese tiempo, se cuantificó el número de toques con ambas patas delanteras, los toques con la pata ipsilateral (del lado de la lesión) y los toques con la pata contralateral (lado opuesto de la lesión). El porcentaje de uso de ambas patas se obtuvo de multiplicar el número de toques con ambas patas por 100 y dividirlo entre el número de toques totales. El número total de toques corresponde a la sumatoria del número de toques con ambas patas, más los de la pata derecha, más los de la izquierda (Woodlee et al., 2005). Los datos se expresan como el porcentaje de uso de ambas extremidades, el porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral y el porcentaje de uso de la extremidad contralateral a la lesión.

Utilizando los mismo datos se graficó la puntuación de asimetría. Este dato se calculó al sumar los contactos ipsilaterales + $\frac{1}{2}$ el número de contactos con ambas extremidades, entre el número de contactos totales (contactos ipsilaterales + contralaterales + contactos con ambas patas). Esta gráfica provee una puntuación de la asimetría total, donde valores de 0.5 indica una exploración asimétricamente con ambas patas, valores > 0.5 indican mayor dependencia en el uso de la extremidad ipsilesionada a lado de la lesión, y valores > 0.5 indican una mayor dependencia a utilizar la extremidad contralateral al sitio de la lesión.

6.5.2. Conducta de rotación

La conducta de rotación se evaluó 6 días después de la inyección intraestriatal con SSI o QUIN. Para inducir rotaciones ipsilaterales (al sitio de la lesión), a cada animal se le administró apomorfina (1 mg/kg s.c.) disuelta en solución salina e inmediatamente se colocaron en una caja de acrílico para su observación. Cinco minutos después de la inyección con apomorfina se registró el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h. Cada rotación se definió como un giro completo de 360°. Los datos se expresan como el número de giros ipsilaterales en 1 h.

6.6. Obtención de los cerebros para las tinciones de Hematoxilina & Eosina (H&E), Fluoro-Jade B (FJ-B) e inmunohistoquímica

Siete días después de la inyección con QUIN o solución salina, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (solución inyectable, 200 mg/kg, *i.p.*) y se perfundieron vía transcardíaca con solución salina que contenía heparina en una proporción de 1/500 (v/v), seguida de una solución de p-formaldehído 4% (v/v). Los cerebros se disecaron y se fijaron en una solución de p-formaldehído 4% durante 48 h. Posteriormente, se deshidrataron gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol y se embebieron en parafina Paraplast Plus (McCormick scientific, St. Louis, MO, USA). Se obtuvieron cortes de 5 -8 μm de grosor en un micrótopo 820 Histo-STAT (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, EEUU), cada 50 μm de corte cubriendo una distancia de 300 μm (100 μm anteriores y 100 μm posteriores a la lesión).

6.7. Tinción H&E

Se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para la visualización de los cuerpos celulares (Millipore technical publications, Billerica, MA, EEUU). La cuantificación se realizó en un analizador de imágenes IM 1000 (Leica, Cambridge, UK). El criterio seguido para la identificación de daño incluyó principalmente la presencia de núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática, y pérdida de la basofilia (cariolisis). Los campos se eligieron de la zona dorso-medial del estriado inyectado. Los datos se expresan como porcentaje de células sanas por campo.

6.8. Tinción de verde de Fluoro-Jade B (FJ-B)

Como marcador de degeneración neuronal se realizó la tinción a FJ-B (Schmued & Hopkins, 2000). Se obtuvieron cortes de 8 μm de grosor, los cuales se sumergieron en xilol durante 10 min, en etanol 100% por 2 min, seguidos de una solución de NaOH 1% - etanol 80% durante 5 min y finalmente 2 min en etanol 70% (Millipore technical publications, Billerica, MA, EEUU). Posteriormente, los cortes se sumergieron en una solución de KMnO_4 0.06% durante 10 min en agitación moderada, para luego enjuagar con agua destilada durante 2 min. Las muestras se tiñeron con una solución de FJ-B al 0.0004% durante 20 min y se realizaron 3 lavados con agua destilada. El exceso de agua fue removido colocando las laminillas en una estufa a 50°C durante 15 min. Finalmente se colocaron en xilol y se cubrieron con medio de montaje no acuoso. Los resultados se expresan como el número de células positivas a FJ-B por campo.

6.9. Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor, los cuales se sumergieron en xilol durante 20 min, luego se colocaron en una solución de citrato de sodio 5% con Tritón X-100 0.2% para desenmascarar el antígeno (Colín-González et al., 2013). La actividad de la peroxidasa endógena se inactiva con H_2O_2 1%. Para evitar uniones inespecíficas, los cortes se bloquearon con una solución de ASB 0.01% durante 1 h. Los cortes se incubaron con anticuerpos anti-GPx (1:200), anti-GR (1:200) y anti- γ -GCLc (1:200) durante 1 h, luego las muestras fueron incubadas con el Kit Universal (anticuerpo secundario, peroxidasa).

Posteriormente, los cortes fueron revelados con 3,3'-diaminobencidina, se sumergieron en una solución de hematoxilina (contratinción nuclear) y se cubrieron con medio de montaje no acuoso. Los resultados se expresan como el número de células positivas por campo.

6.10. Obtención de la fracción nuclear para la determinación de Nrf2

La obtención de las fracciones nucleares se realizó según el protocolo descrito en el Kit TransAM-Nrf2, Active Motif, Inc. (Carlsbad, CA, EE.UU.). Siete días después de la inyección con QUIN o solución salina, los animales fueron decapitados y los cerebros fueron removidos rápidamente. Se diseccionó en frío el cuerpo estriado inyectado y se lavó con PBS frío, se lisó con un homogenizador pre-enfriado en 300 μ l de buffer HB (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 1 mM y DTT 1 mM, que contenía: 1 μ g/ μ l de inhibidores de coctel de proteasas y fosfatasa, PMSF 1 mM y Nonidet P-40 0.5%, y se incubaron en hielo durante 15 min. El homogenado se centrifugó a 850 x *g* durante 10 min a 4°C, el sobrenadante obtenido (fracción citoplasmática, SN1) fue recolectada y almacenada a -80°C. El pellet se resuspendió en 500 μ l de buffer HB y se transfirió a un tubo eppendorf pre-enfriado, posteriormente se incubó en hielo durante 15 min. Se adicionó Nonidet P-40 0.5% y se incubó en hielo durante 5 min, pasado el tiempo se agitó a velocidad máxima durante 10 seg. La suspensión obtenida fue centrifugada a 14,000 x *g* durante 30 seg a 4°C, luego el sobrenadante fue recolectado en SN1. El pellet fue resuspendido en 75 μ l de buffer de lisis completo (HEPES 20 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, glicerol 20%, NaCl 420 mM y DTT 1 mM) más 1 μ g/ μ l de inhibidores de coctel de proteasas y fosfatasa y PMSF 1 mM, luego se agitó a velocidad máxima durante 10 seg y se incubó en hielo en un agitador orbital a 150 rpm durante 30 min. La suspensión resultante se agitó a velocidad máxima durante 30 seg y se centrifugó a 14,000 x *g* durante 10 min a 4°C. Finalmente, se recolectó el sobrenadante (fracción nuclear, SN2) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.11. Análisis por Western Blot

Cantidades iguales de proteína (80 μ g) fueron separadas por electroforesis en un gel de acrilamida 10% y transferidas a una membrana de PVDF (Kurien & Scofield, 2003). Las membranas se bloquearon 2 h con una solución de albúmina al 5% a temperatura

ambiente en agitación. Después se incubaron con el anticuerpo policlonal primario anti-Nrf2 (1:1000) y anti-PCNA (1:1000) a 4°C toda la noche en agitación. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón (1:10000) por 2 h a temperatura ambiente en agitación lenta. Los valores de densidad óptica (D.O.) relativa para cada banda se analizaron con el programa ImageJ y se normalizaron con la densidad óptica de la banda correspondiente a PCNA. Los resultados se expresan como la D.O. relativa de Nrf2/PCNA.

6.12. Obtención de tejido para la medición de la actividad enzimática y niveles de glutatión

Siete días después de la inyección con QUIN o solución salina, los animales fueron decapitados y los cerebros fueron removidos rápidamente. Se diseccionó en frío el cuerpo estriado inyectado y el tejido se congeló a -80 °C hasta su uso. El tejido se homogenizó en 500 µl de amortiguador de lisis frío pH 7.9 que contiene Tris-Base 20 mM, NaCl 30 mM, Sacarosa 0.5 mM y Triton 0.1 %, enriquecido con inhibidores de proteasas (leupeptina 1µl/ml, aprotinina 1µl/ml, pepstatina 1µl/ml y PMSF 1 µM). Luego se centrifugó a 20,800 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para los ensayos de la actividad enzimática.

6.13. Actividad enzimática

6.13.1. Glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx se midió mediante un método espectrofotométrico basado en el consumo de NADPH previamente descrito (Carlberg & Mannervik, 1975). La mezcla de reacción consistió de un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutatión reductasa 1 U/ml y glutatión reducido 1 mM. Cien microlitros de tejido homogenizado fue adicionado a 0.8 ml de mezcla de reacción e incubado 5 min a temperatura ambiente antes de iniciar la reacción por la adición de 0.1 ml de H₂O₂ 30%. La actividad enzimática se cuantificó midiendo la desaparición de NADPH

cada 15 seg durante 2 min a 340 nm. Los resultados se expresan como U/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.13.2. Glutación reductasa (GR)

La actividad de GR se midió por un método previamente descrito (Carlberg & Mannervik, 1975). La mezcla de reacción consistió de amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6, EDTA 1 mM, glutación oxidado 1 mM y NADPH 1 mM. Cien microlitros de homogenizado se adicionaron a 0.9 ml de la mezcla de reacción, en un volumen total de 1 ml. La actividad enzimática se cuantificó midiendo la desaparición de NADPH cada 15 seg durante 2 min a 340 nm. Los resultados se expresan como U/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.13.3. Glutación-S-transferasa (GST)

La actividad de la GST se midió usando CDNB como sustrato según un método descrito anteriormente (Habig et al., 1974). La mezcla de reacción consistió de amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 6.5, GSH 1 mM y CDNB 1 mM. Este ensayo se realizó con 100 μL de homogenizado en un volumen total de 1 ml. El incremento en la absorbancia se registró cada 30 seg durante 3 min a 340 nm. Los resultados se expresan como U/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.13.4. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

La actividad de la G6DH se midió por un método previamente descrito (Glock & Mclean, 1953). La mezcla de reacción consistió de un amortiguador Tris-HCl 55 mM, pH 7.8 con MgCl_2 3.3 mM, D-glucosa-6-fosfato 100 mM y β -NADP 6 mM. Díez microlitros de homogenizado se adicionaron a 0.290 ml de mezcla de reacción, en un volumen total de 0.3 ml. La formación de NADPH se reflejó en el incremento en la absorbancia, la cual se registró cada min durante 10 min a 340 nm. Los resultados se expresan como U/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.14. Niveles de GSH

Los niveles de GSH se midieron empleando un ensayo fluorométrico modificado (Hissin & Hilf, 1976). El estriado diseccionado se mantuvo en hielo y se sonicó en 750 μ l de amortiguador de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM, pH 8.0. A 500 μ l del homogenizado se les añadió 1 ml de HPO₃ 25% y se centrifugaron a 3000 x *g* durante 15 min a temperatura ambiente. El resto del homogenado se reservó para cuantificar proteínas por el método de Lowry. De la muestra que contiene HPO₃ 25% se tomaron 500 μ l y se les añadió 4.5 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM, pH 8.0, se agitó. De esta mezcla se tomaron 100 μ l, a los que se les añadió 1.8 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM pH 8.0 y 100 μ l de OPA. Los tubos se incubaron 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se registró el valor de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 420 nm y de excitación de 350 nm. Los resultados se expresan como μ g de GSH/mg de proteína.

6.15. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tuckey, usando el software Prism 5.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de $P > 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

7.1. Valoración motora

Los datos obtenidos en la evaluación motora, muestran que el uso de ambas extremidades delanteras mejoró aproximadamente un 28% a los 6 días de tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) con respecto al grupo QUIN. No se observó diferencia significativa entre los grupos SHAM y CUR en ningún día de evaluación (**Figura 1**). Por otro lado, la infusión de QUIN (grupo QUIN) ocasionó un aumento significativo en el uso de la extremidad ipsilateral a la lesión (controlada por el estriado dañado) con respecto a los grupos SHAM y CUR (quienes muestran un ligero aumento al día 6, el cual no fue significativo con respecto al día -1); mientras que los animales que recibieron la administración oral de CUR (grupo QUIN+CUR) mostraron una disminución en el porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral a la lesión al día 6 con respecto al grupo QUIN (**Figura 2**). El QUIN (grupo QUIN) ocasionó una disminución en el uso de la extremidad contralateral a la lesión que se mantuvo hasta el día 6 (**Figura 3**). En los animales que recibieron el tratamiento con CUR (QUIN+CUR) aumentó significativamente el uso de la extremidad delantera contralateral en el día 6 con respecto al grupo QUIN.

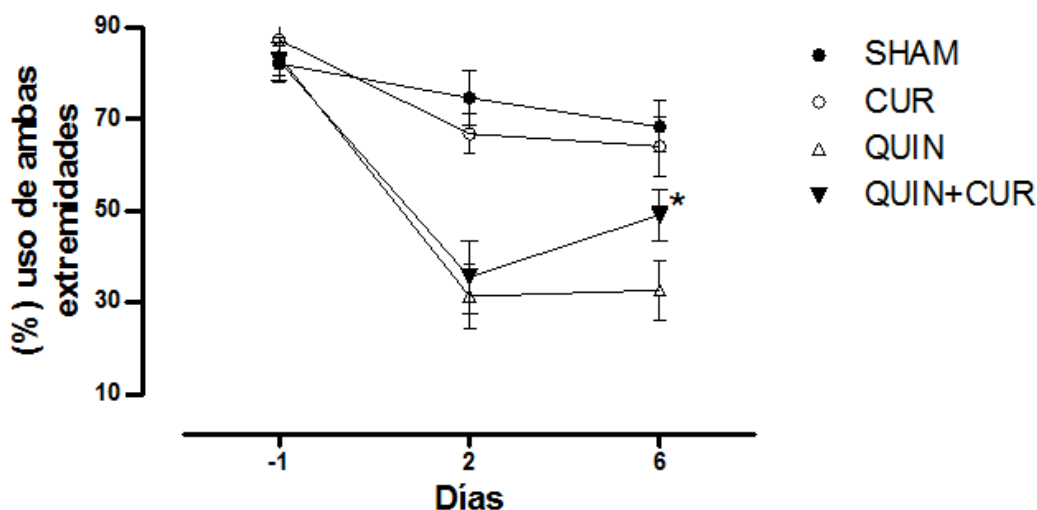


Figura 1. Porcentaje de uso de ambas extremidades delanteras en la prueba de simetría motora. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores son la media \pm SEM (n=5). *P<0.05 vs QUIN (día 2).

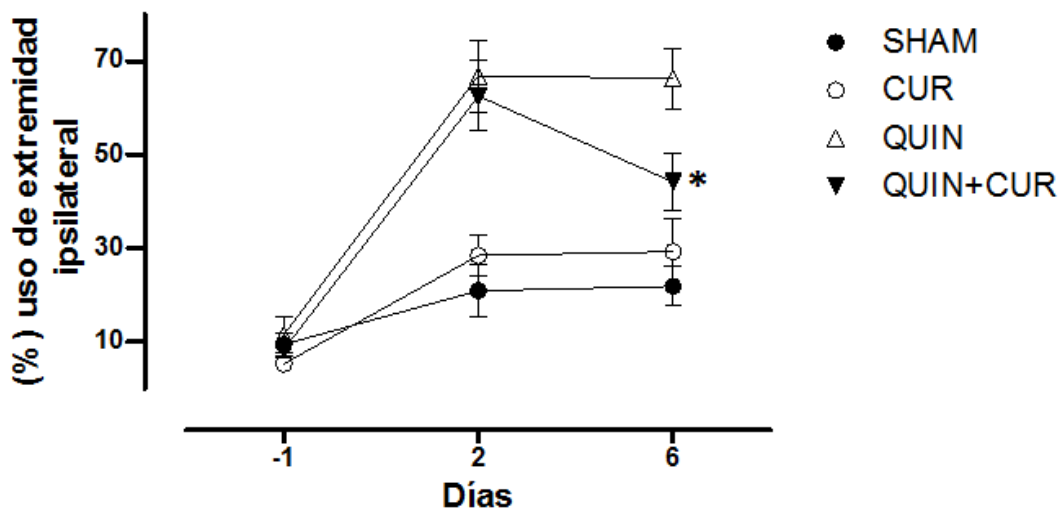


Figura 2. Porcentaje de uso de la extremidad delantera ipsilateral a la lesión en la prueba de simetría motora. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores son la media \pm SEM (n=5). *P<0.05 vs QUIN.

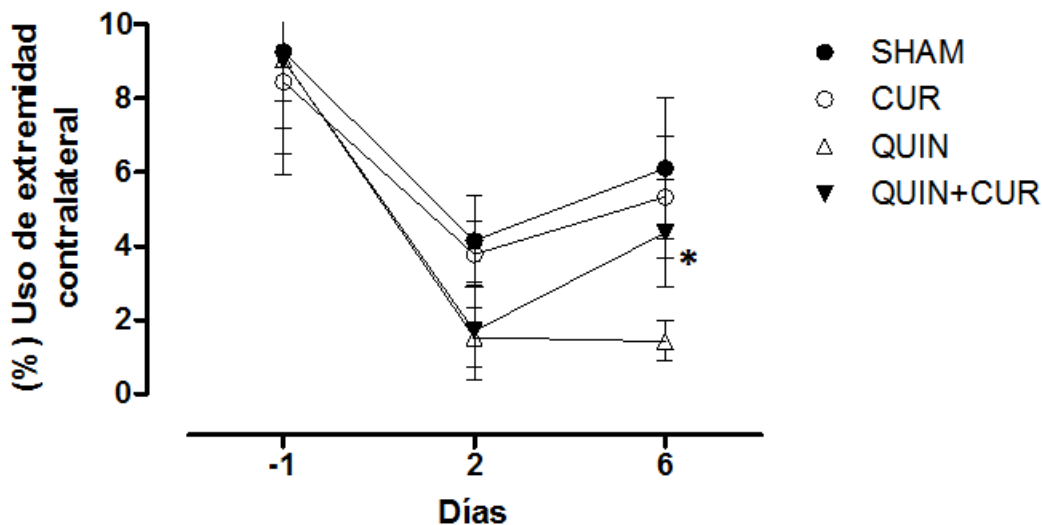


Figura 3. Porcentaje de uso de la extremidad delantera contralateral a la lesión en la prueba de simetría motora. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores son la media \pm SEM (n=5). *P<0.05 vs QUIN.

En la **figura 4** se graficó la puntuación de asimetría, donde se observó que al día -1 todos los animales mostraron una exploración simétrica con ambas patas (valores cercanos a 0.5). Los grupos que recibieron la infusión con QUIN (grupos QUIN y QUIN+CUR) mostraron un incremento significativo en la puntuación (0.81 y 0.78 respectivamente). Al día 6 el puntaje del grupo QUIN+CUR disminuyó significativamente (0.65) respecto al grupo QUIN (0.83). Los valores en los grupos SHAM y CUR mostraron un incremento no significativo a los días 2 y 6 de la prueba respecto al día -1.

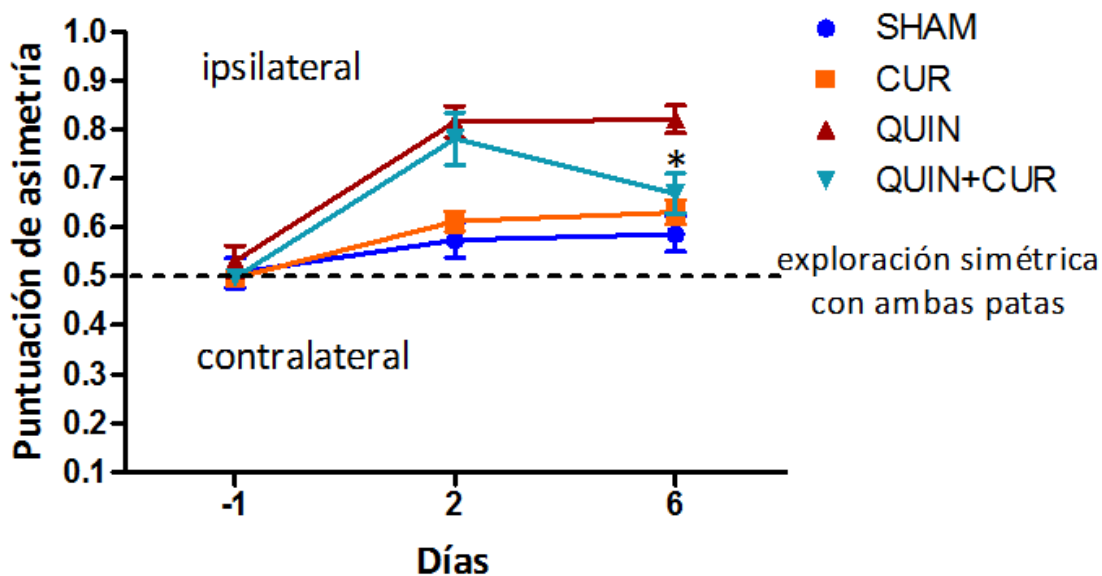


Figura 4. Efecto de la curcumina (CUR) sobre la puntuación de asimetría. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores son la media \pm SEM (n=5). *P<0.05 vs QUIN.

Adicionalmente, una mejoría significativa se observó en la prueba de conducta de rotación, tras el tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) (**Figura 5**). En el grupo QUIN se observó un aumento significativo de giros, con respecto a los grupos SHAM y CUR. La administración diaria de CUR (grupo QUIN+CUR) mejoró en la conducta de rotación, al reducir significativamente el número de giros ipsilaterales con respecto a los observados en el grupo QUIN (**Figura 5**).

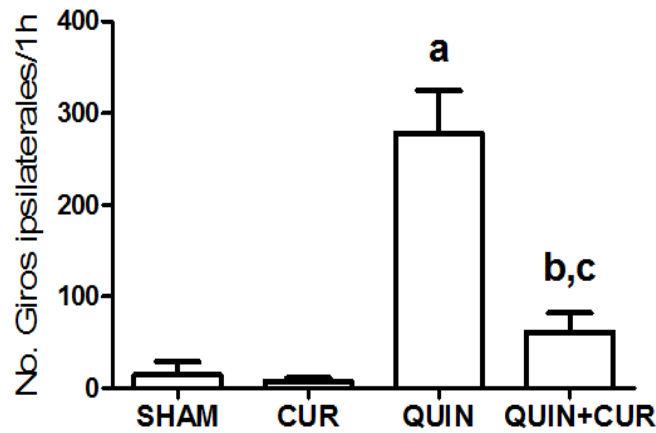
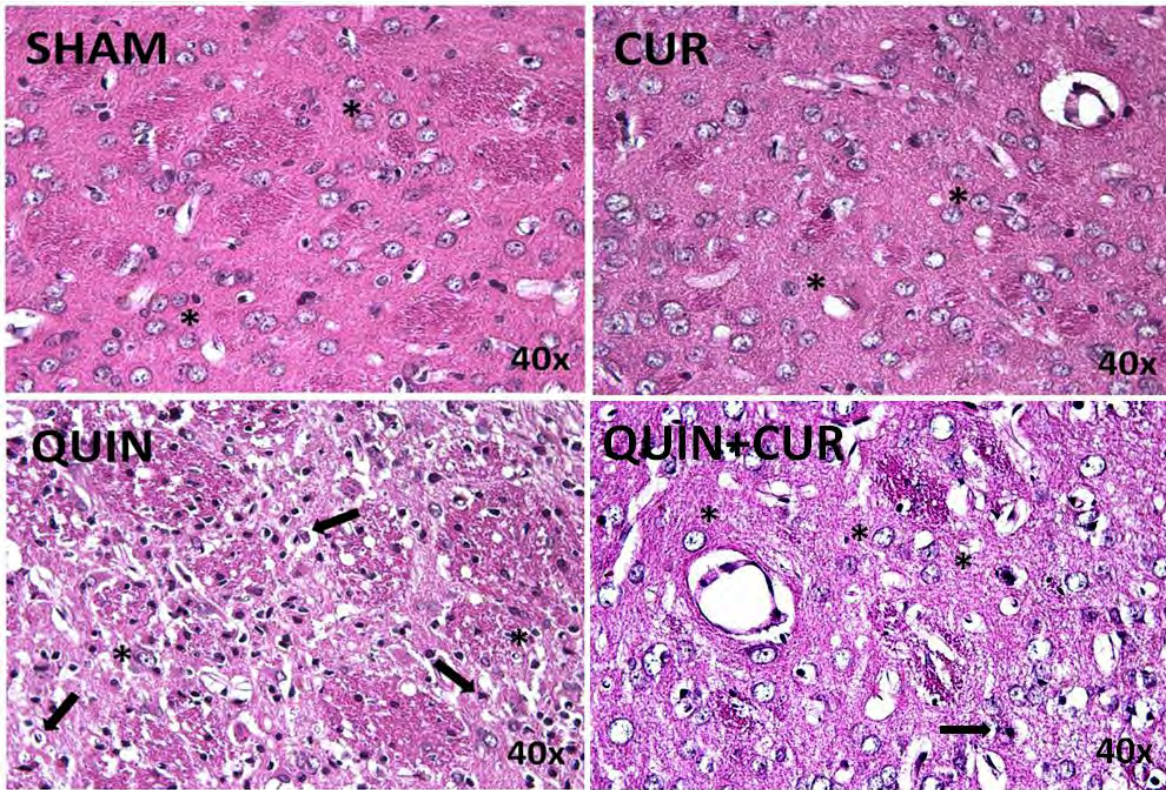


Figura 5. Efecto de la curcumina (CUR) sobre la conducta de rotación inducida por el ácido quinolínico (QUIN). Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Se muestra el número de giros ipsilaterales en cada grupo durante 1 h, después de la administración de apomorfina (1 mg/kg, s.c.). La evaluación se llevó a cabo 6 días después de la inyección intraestriatal. Los valores son la media \pm SEM (n=5). ^aP<0.001 vs SHAM y CUR, ^bP<0.05 vs SHAM y CUR, ^cP<0.01 vs QUIN.

7.2. Cambios histológicos en las células estriatales

La infusión de QUIN en el estriado produjo lesiones notables en la morfología celular. Se observa una extensa picnosis, células que presentan degradación y condensación de DNA, hinchazón celular y cariólisis, acompañado de un considerable daño al neuropilo (**Figura 6A**). Este patrón de daño ocasionó una disminución significativa en el número de células preservadas propias del estriado (grupo QUIN) el cual se preservó en el grupo que recibió el tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR), ya que muestra un mayor porcentaje de células preservadas (>50%), con respecto al grupo QUIN. Los grupos SHAM y CUR no mostraron una diferencia significativa (**Figura 6D**).

A)



B)

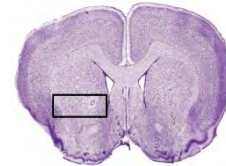
Células dañadas:



Células preservadas (sanas):



C)



D)

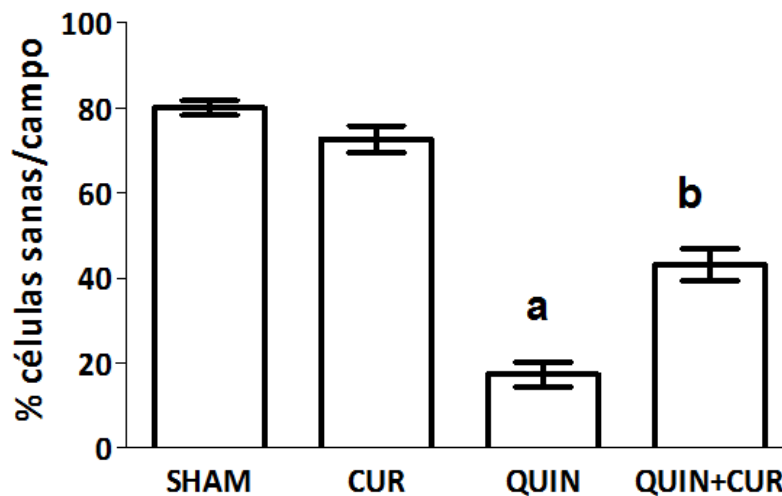


Figura 6. Efecto de la curcumina (CUR) sobre el daño inducido por el ácido quinolínico (QUIN). Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo 7 días después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. En el panel **A**, se muestra una imagen representativa de cada grupo con la tinción de H&E (40x). Los asteriscos muestran células preservadas propias del estriado. Las flechas indican células dañadas. En el panel **B**, se muestran los criterios utilizados para discriminar las células dañadas de las sanas. En el panel **C**, se graficó el porcentaje de células preservadas por campo. En el panel **C**, se muestra un corte coronal de cerebro de rata, indicando la zona del estriado de la cual se obtuvieron los campos para realizar la cuantificación (según las coordenadas indicadas en la parte de métodos). Los valores son la media \pm SEM (n=5). ^aP<0.001 vs SHAM y CUR, ^bP<0.01 vs SHAM y QUIN.

7.3. Valoración de la degeneración de las células del estriado

No se observan células positivas a FJ-B en los campos ipsilaterales de los grupos SHAM y CUR, así como sus los campos contralaterales a la lesión correspondientes (**Figura 7A**). El tratamiento con QUIN incrementó considerablemente el número de células positivas a FJ-B en el lado ipsilateral con respecto al lado contralateral a la inyección y con respecto a los grupos SHAM y CUR. Finalmente, la administración diaria de CUR (grupo QUIN+CUR) disminuyó de forma significativa (50 % \pm 2.84, P<0.01) la neurodegeneración observada en el grupo con QUIN (**Figura 7A y 7B**).

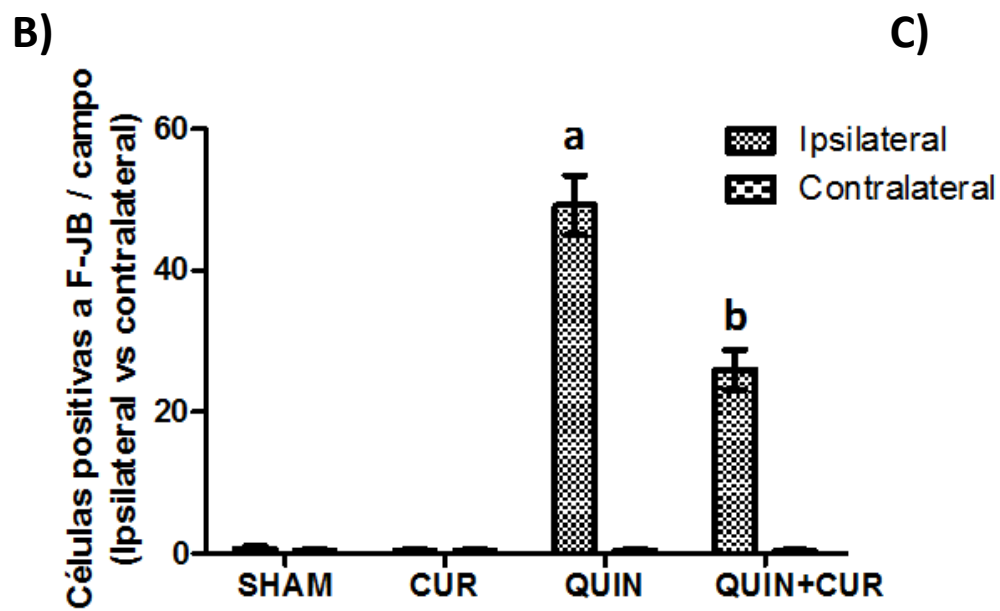
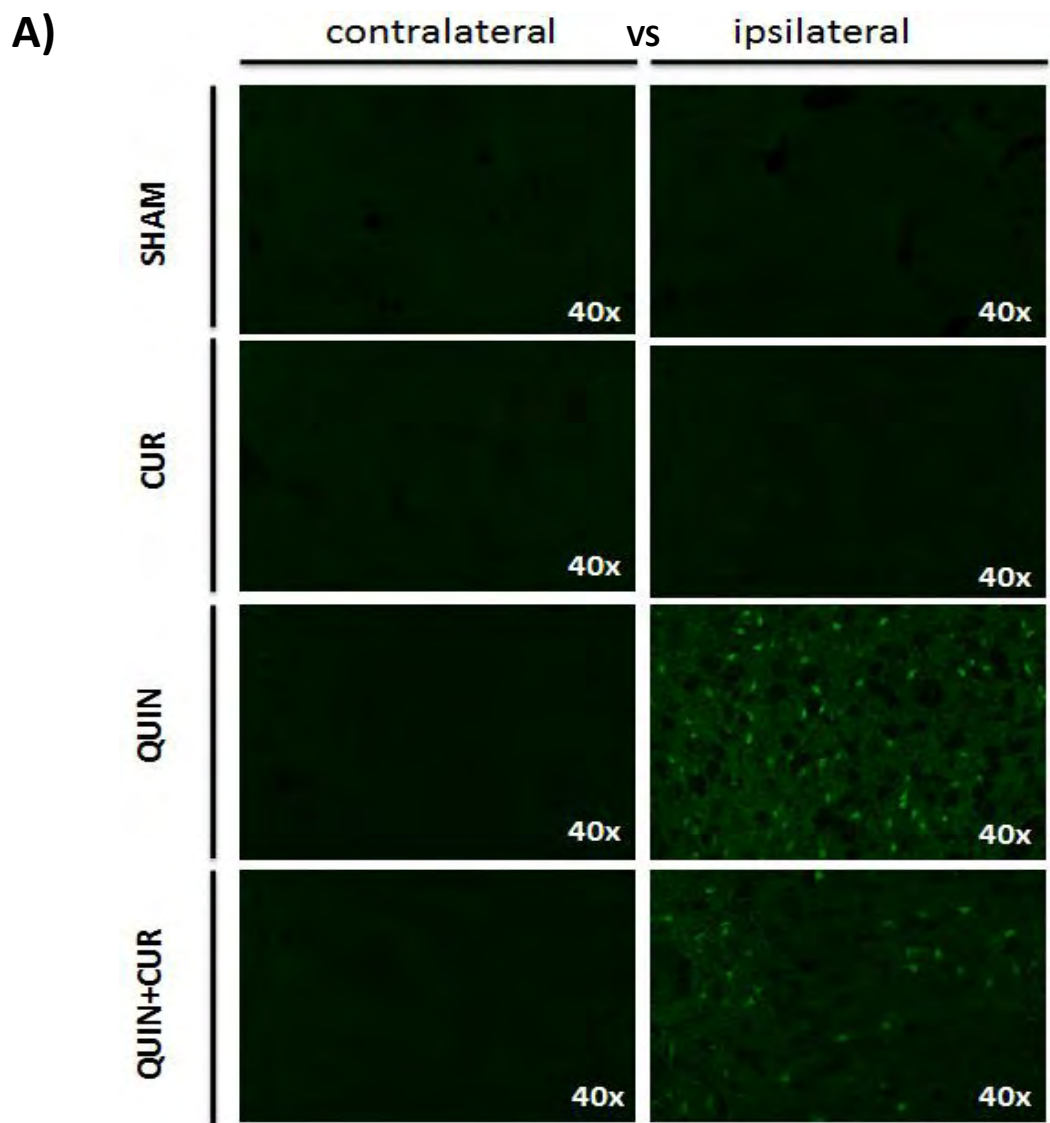


Figura 7. Efecto de la curcumina (CUR) sobre el número de células positivas a FJ-B. Se inyectó en el estriado derecho 1 µl de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Siete días después de la infusión intraestriatal, se realizó la tinción de FJ-B, como marcador de neurodegeneración. En el panel **A**, se muestran las imágenes representativas (40x) del lado ipsilateral y contralateral a la lesión de cada grupo. Las imágenes contralaterales a la lesión fungieron como controles. En el panel **B**, se muestra el conteo de células positivas a FJ-B. En el panel **C**, se muestra la zona donde se obtuvieron los campos para realizar el conteo cuantificación (según las coordenadas indicadas en la parte de métodos). Los valores son la media ± SEM (n=5). ^aP<0.001 vs SHAM y CUR, ^bP<0.01 vs QUIN.

7.4. Niveles de Nrf2 en fracciones nucleares en estriado de rata

El análisis mediante western blot mostró un incremento significativo de la proteína Nrf2 en extractos nucleares de estriado de los animales tratados con CUR con respecto al grupo SHAM (^aP<0.05). Por otro lado, a los 6 días se encontró que la administración de QUIN generó un decremento en los niveles del factor de transcripción Nrf2, con respecto a los grupos SHAM y CUR (3.2 y 4.1 veces, respectivamente), mientras que la administración diaria de CUR bloqueó la disminución de Nrf2 inducida por el QUIN (grupo QUIN+ CUR) (3.4 veces mayor que el grupo QUIN) (**Figura 8**).

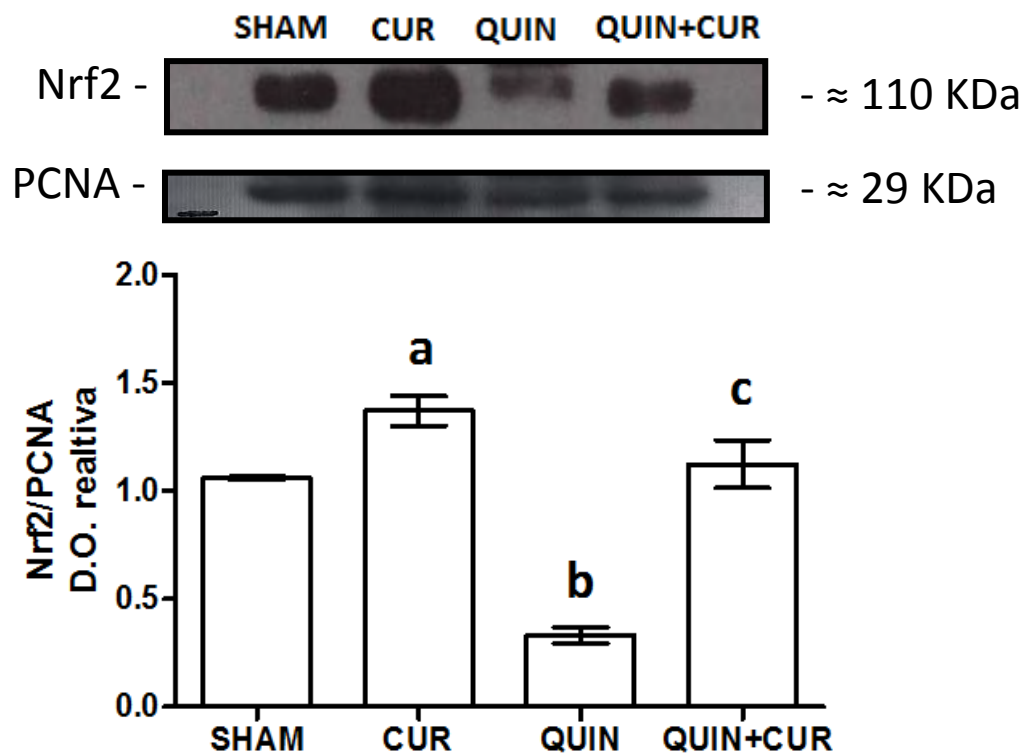


Figura 8. Efecto de la curcumina (CUR) y el ácido quinolínico (QUIN) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en el estriado. La dosis de QUIN fue 240 nmol. Los animales recibieron 6 dosis diarias de CUR de 400 mg/kg. La evaluación se llevó a cabo 24 h después de la última administración de CUR. Los valores son la media \pm SEM (n=5). ^aP<0.05 vs SHAM, ^bP<0.01 vs SHAM y ^cP<0.01 vs QUIN.

7.5. Porcentaje de proteínas de fase II en el estriado de rata

El tratamiento con CUR (grupo CUR) aumentó significativamente el porcentaje de células inmuno-positivas a GPx y GR con respecto al observado en el grupo SHAM (83.5% \pm 2.07, ^aP<0.001 y 174.2 % \pm 2.06, ^aP<0.001, respectivamente). El porcentaje de células inmuno-positivas a GPx, GR y γ -GCLc en el grupo QUIN fue significativamente disminuido respecto al grupo SHAM (52.7 % \pm 2.48, ^bP<0.05; 75.4 % \pm 1.13, ^bP<0.001 y 68.7 % \pm 1.27, ^dP<0.05, respectivamente). El grupo experimental que recibió el tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR), mostró un porcentaje similar al observado en el grupo SHAM para las enzimas GR y γ -GCLc y solo en el caso de la GPx este porcentaje fue mayor que el grupo SHAM (69.7 % con P<0.05) (**Figura 9**). Finalmente, el porcentaje de células inmuno-positivas a GPx, GR y γ -GCLc en el grupo QUIN+CUR estuvo significativamente mayor respecto al grupo QUIN a los 7 días (300 % \pm 2.34, ^cP<0.001; 406 % \pm 1.30, ^cP<0.001 y 147 % \pm 1.15 con ^eP<0.05, respectivamente).

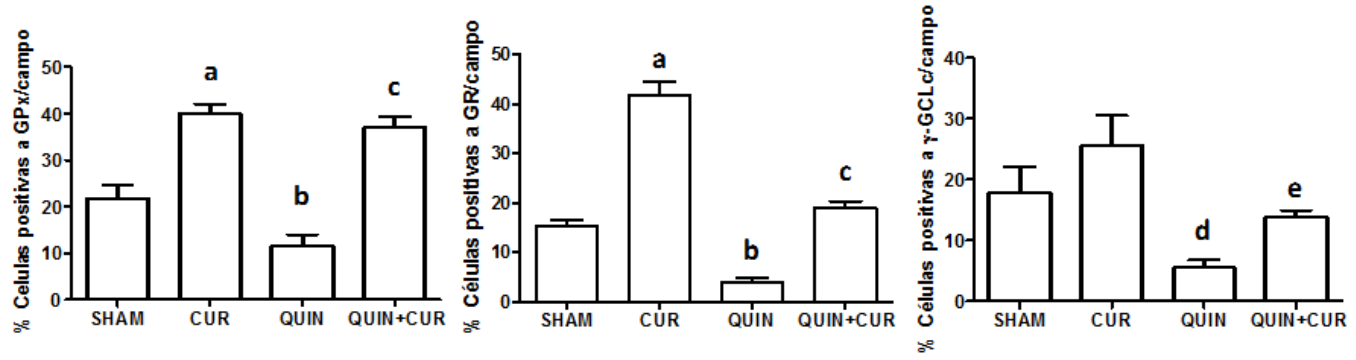
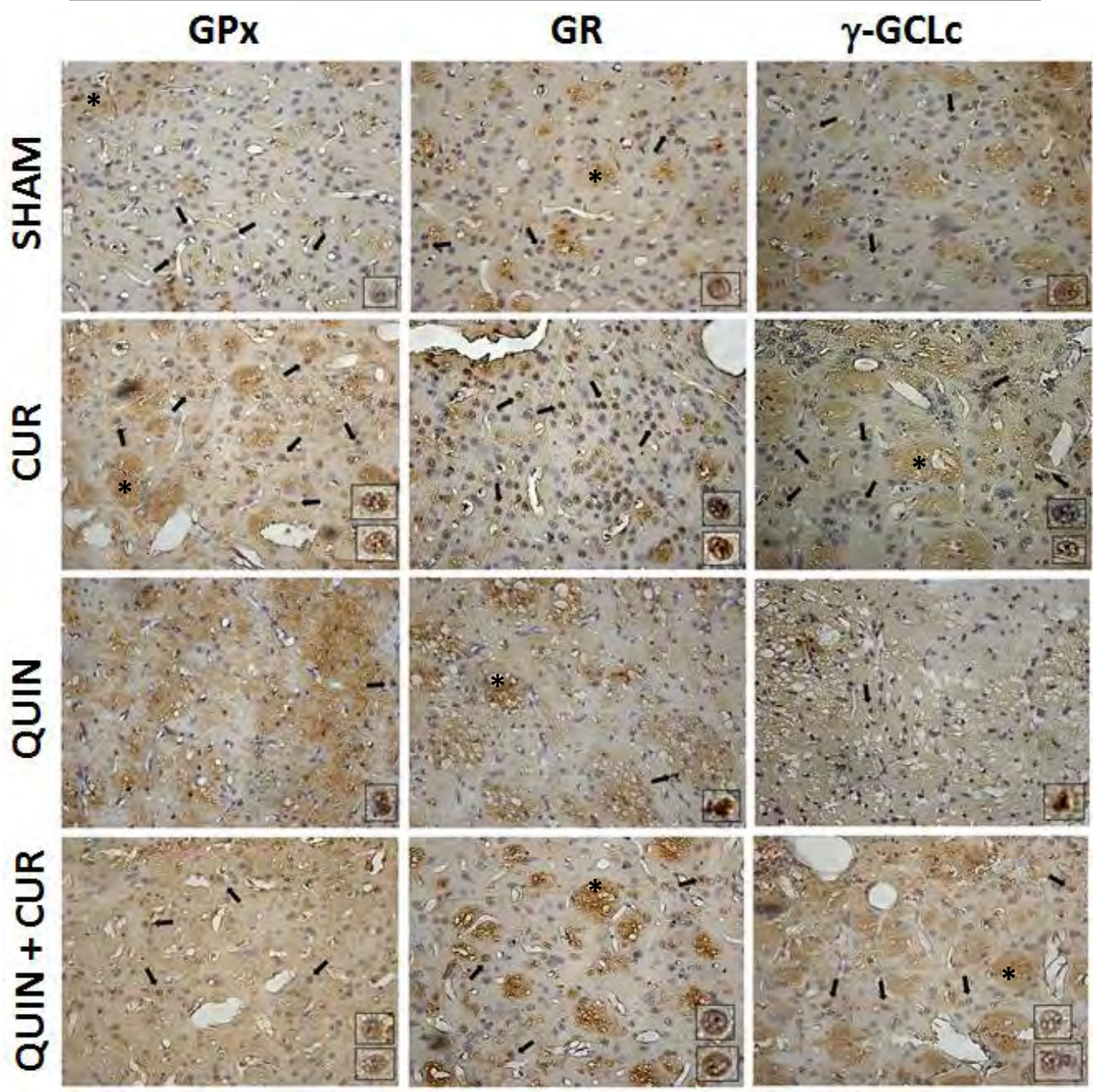


Figura 9. Efecto de la curcumina (CUR) y del ácido quinolínico (QUIN) sobre el número de células positivas a Gpx, GR y γ -GCLc. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. En el panel superior, se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica después de 7 días de la infusión intraestriatal. En la primera columna (de izquierda a derecha) se muestran células positivas a GPx, en la segunda columna, se muestran células positivas a GR y en la tercera columna se muestran células positivas a γ -GCLc. Las **flechas negras** señalan células positivas a cada enzima en el campo. En los recuadros se muestra el acercamiento de una célula positiva en cada grupo. El asterisco, muestra fibras características del estriado que se alcanzaron a teñir. Estas fibras presentan daño (huecos) en los grupos de animales que recibieron QUIN. En el panel inferior se muestran las gráficas del conteo de células positivas para cada enzima. Los cortes se obtuvieron como se describe en la metodología. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=5). ^aP<0.001 vs SHAM, ^bP<0.05 vs SHAM, ^cP<0.001 vs QUIN, ^dP<0.05 vs SHAM y ^eP<0.05 vs QUIN.

7.6. Actividad de las proteínas de fase II

La actividad enzimática de la GR (**Figura 10B**) incremento en el grupo CUR con respecto al grupo SHAM ($15.7\% \pm 0.0005$, $^aP < 0.05$), mientras que la actividad de la GPx (**Figura 10A**) y GST (**Figura 10C**) mostraron una tendencia a incrementar, pero sin cambios significativos. La actividad de G6PD (**Figura 10D**) no mostró cambios en los grupos SHAM y CUR. El tratamiento con QUIN disminuyó significativamente la actividad de las 4 (GPx, GR, GST y G6PD) enzimas con respecto al grupo SHAM ($72\% \pm 0.0008$, $^bP < 0.05$; $19.7\% \pm 0.0002$, $^bP < 0.05$; $20\% \pm 0.022$, $^bP < 0.05$ y $58.2\% \pm 0.004$, $^bP < 0.001$, respectivamente). Finalmente, el tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) recuperó la actividad de las 4 enzimas con valores similares a los observados en el grupo SHAM, dejando los valores de actividad mayores a los del grupo QUIN ($65.8\% \pm 0.0069$, $^cP < 0.05$; $25\% \pm 0.0003$, $^cP < 0.05$; $30.2\% \pm 0.042$, $^cP < 0.05$; $30\% \pm 0.012$, $^cP < 0.05$) (**Figura 10A, B, C y D**).

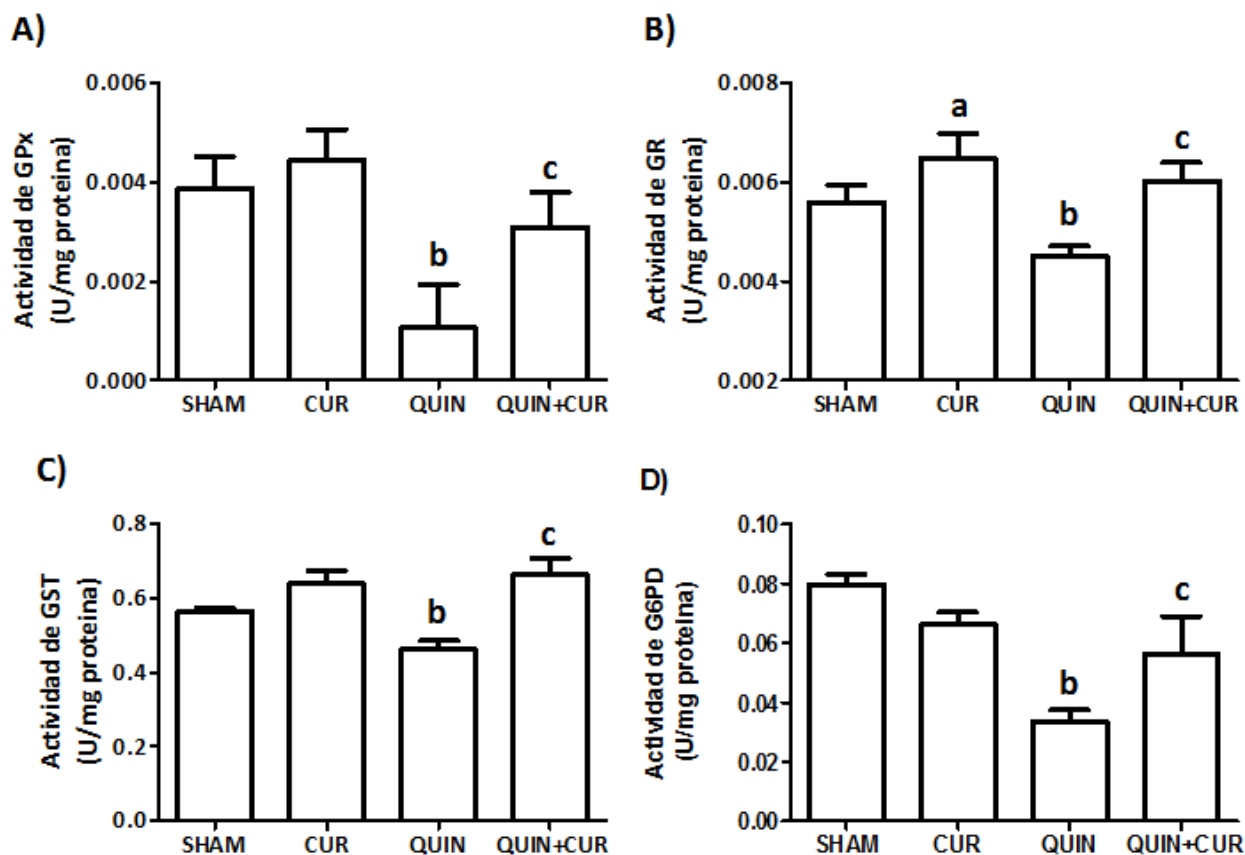


Figura 10. Efecto de la curcumina (CUR) y del ácido quinolínico (QUIN) sobre la actividad enzimática de **A)** la Glutación peroxidasa (GPx), **B)** la glutación reductasa (GR), **C)** la glutación S-transferasa (GST) y **D)** la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN)

equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo 7 días después de la inyección intraestriatal. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=5). ^aP<0.05 vs grupo SHAM, ^bP<0.05 vs grupo SHAM, ^cP<0.05 vs grupo QUIN.

7.9. Niveles de GSH en el estriado de rata

Los niveles de GSH en el estriado de los animales del grupo SHAM fueron 68 ± 2.1 μ g/mg de proteína y un nivel muy similar se observó en el grupo con CUR. Por otro lado, la infusión de QUIN indujo una disminución de los niveles de GSH (40.5 ± 3.2 μ g/mg de proteína), mientras que el tratamiento con CUR evitó esta caída (QUIN+CUR: 56.4 ± 3.6 μ g/mg de proteína) (Figura 11).

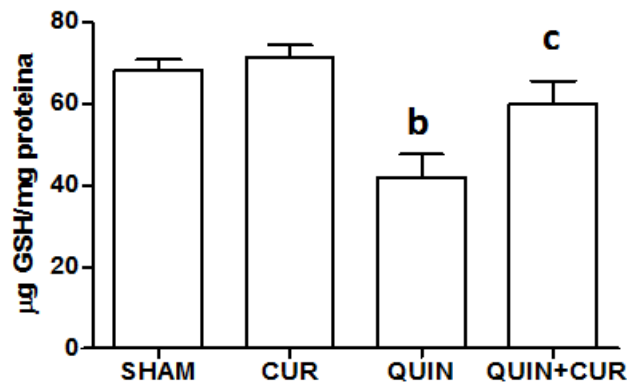


Figura 11. Efecto de la curcumina (CUR) y del ácido quinolínico (QUIN) sobre los niveles de glutatión (GSH). Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de curcumina (CUR) de 400 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo 7 días después de la infusión intraestriatal. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=5). ^bP<0.01 vs SHAM y ^cP<0.05 vs QUIN.

8. DISCUSIÓN

8.1. La CUR mejora el déficit motor inducido con el QUIN

En un esfuerzo por encontrar opciones terapéuticas para este tipo de enfermedades, la forma más plausible y visible, para determinar si un tratamiento está teniendo algún efecto positivo (protector) considerable, es ver si su administración se ve reflejada en una mejoría en la valoración motora, cuya función se ve alterada durante el progreso de estas enfermedades. Sin embargo, las dificultades encontradas en la transferencia de terapias exitosas de animales a ensayos clínicos en humanos han puesto en evidencia la necesidad de encontrar pruebas adecuadas en animales, que sean lo suficientemente sensibles para reflejar el daño ocasionado por una lesión y el efecto de las intervenciones terapéuticas. Especialmente las pruebas utilizadas deben reflejar la función de las áreas del cerebro examinadas y ser mínimamente influenciadas por las estrategias compensatorias de las ratas y los humanos (Woodlee et al., 2005). En este estudio, encontramos que la administración diaria de la CUR tras la infusión con QUIN, provocó una mejoría significativa en las pruebas utilizadas para evaluar el daño del animal. Como primer prueba, utilizamos la prueba del cilindro, la cual ha sido utilizada previamente para examinar los efectos benéficos de tratamientos terapéuticos en modelos de infusiones unilaterales de disminución de dopamina (infusión de 6-OHDA), al correlacionar el uso de las extremidades ipsilaterales versus los contactos con la extremidad contralateral como función de la disminución de los niveles dopaminérgicos (Choi-Lundberg et al., 1998).

La infusión con QUIN ocasionó una disminución de aproximadamente el 60% de las células preservadas en el estriado con respecto al grupo SHAM (**Figura 6**). Lo que sugiere que el aumento en el número de contactos con la extremidad ipsilesionada y la disminución en el número de contactos con ambas patas (acción considerada como normal) (**Figura 1**), así como la disminución en el uso de la extremidad contralateral, se deba, probablemente a la disminución en la población celular en el estriado, como consecuencia del tratamiento con QUIN en los días 2 y 6 después de la inyección intraestriatal. Por otra parte, el mayor número de células preservadas tras el tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) podría ser la causa de la disminución en el uso de la extremidad ipsilesionada (**Figura 2**) y con el

aumento en el uso de la extremidad contralateral (**Figura 3**). El incremento en el uso de la extremidad contralateral podría reflejar un menor daño del estriado al día 6, hecho que podría deberse al tratamiento con la CUR (grupo QUIN+CUR). Con estos resultados no se sabe qué tipo de células estriatales son las que se preservan hasta los 7 días, hacen falta más resultados para averiguar primero, si las células preservadas son neuronas o células de la glía, y segundo, saber si son neuronas espinosas medianas o algún tipo de interneuronas del estriado. En la **figura 4** se muestra la dependencia en el uso de la extremidad ipsilesilateral (valores >0.5) y contralateral (valores <0.5) a la lesión respecto a la exploración simétrica con ambas extremidades (valore de 0.5).

Una prueba conductual capaz de reflejar el daño ocasionado por el QUIN es la conducta de rotación. Las ratas lesionadas unilateralmente con QUIN muestran asimetría de rotación en respuesta a agonistas de los receptores de dopamina, tales como la apomorfina (1 mg/kg, s.c.). Esta respuesta de rotación generalmente se asume que representa un desequilibrio en la actividad de la dopamina entre el estriado lesionado y el no-lesionado. Por lo tanto, puesto que el QUIN daña preferentemente a las neuronas post-sinápticas que poseen receptores a dopamina en el cuerpo estriado lesionado, la estimulación preferencial de receptores de dopamina intactos en el cuerpo estriado contralateral a la lesión da lugar a la rotación al sitio de la lesión (giros ipsilaterales) (**Figura 5**) (Norman et al., 1992). El número de estas rotaciones es aproximadamente proporcional al tamaño de la lesión y por lo tanto provee una medida cuantitativa útil de la neurodegeneración estriatal (Schwarcz et al., 2010). En este estudio, la administración de la CUR abolió la generación de giros ipsilaterales. Este efecto puede ser producto de un sistema de compensación de las células del estriado para evitar el daño oxidante ocasionado por el QUIN, lo que posiblemente, se vea reflejado de forma indirecta en un menor número de giros ipsilaterales.

8.2. La CUR disminuye el daño histológico observado en las células del estriado

El patrón de toxicidad del QUIN en concentraciones elevadas ejerce una excesiva excitación de los receptores NMDA, un incremento en la concentración de Ca^{2+}

intracelular y una sobreproducción de EROs. Estos eventos, aunados a falla mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y pérdida del potencial de membrana mitocondrial y plasmática, están relacionados con la muerte celular por necrosis. Entre los cambios morfológicos generados característicos de la muerte celular por necrosis (Syntichaki & Tavernarakis, 2003), están una hinchazón celular, degradación y condensación del ADN, y eventualmente lisis sin la formación de vesículas (**Figura 6A**). Todas estas manifestaciones de daño celular, se visualizan en el tejido tratado con QUIN a los 7 días de la infusión. Como resultado del patrón de toxicidad del QUIN, se observa una pérdida selectiva de las neuronas espinosas medianas en el estriado. Estas neuronas comprenden más del 95% de las células estriatales en el roedor (Tepper et al., 2010). Mientras que el resto de las neuronas estriatales son diferentes clases de interneuronas. En la **gráfica 6D**, se observa un incremento en el porcentaje de células preservadas tras el tratamiento con CUR al día 7 después de la infusión con QUIN. El QUIN actúa de forma selectiva sobre las neuronas espinosas medianas del estriado (Beal et al., 1986; Tattersfield et al., 2004), las cuales están íntimamente relacionadas en la iniciación y el control de los movimientos de las extremidades de cuerpo y de los ojos, lo cual explicaría la mejoría en la valoración motora inducido con el QUIN. Por otra parte, dado que dentro del mecanismo excitotóxico del QUIN se encuentra la liberación del citocromo c, se ha visto en estudios *in vitro*, que el QUIN en concentraciones patológicas promueve la apoptosis en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Guillemin et al., 2005). Así, que posiblemente el daño histológico observado con la tinción de H&E, también esté acompañado por caracteres de muerte celular por apoptosis, aunque este hecho falta por evaluarse.

El QUIN se une selectivamente a los receptores NMDA que expresan la subunidad NR2B, induciendo la sobreproducción de EROs, el incremento en la NOSi, promoviendo la producción de NO y el daño por radicales libres, lo que conduce al daño mitocondrial y ruptura de las hebras de ADN. En este análisis, el daño ocasionado al ADN por el QUIN, se caracteriza por la condensación de la cromatina (núcleos picnóticos) seguida por la fragmentación del núcleo (cariorréxis) y pérdida de capacidad a teñirse con colorantes básicos (cariolisis) (**Figura 6B**) (Majno & Joris, 1995). Se ha reportado que el “*centro*” de la

lesión está caracterizado por presentar una marcada disminución de todos los tipos celulares. Mientras que como consecuencia de la lisis celular, los componentes celulares son liberados, perjudicando células vecinas, induciendo una respuesta inflamatoria y creando una zona de penumbra alrededor del núcleo de la lesión en la cual hay pérdida selectiva de células neuronales. El tratamiento con CUR disminuyó significativamente el daño histológico inducido por el QUIN.

8.3. El tratamiento con CUR reduce la degeneración en las células del estriado ocasionada por el QUIN.

Para examinar la contribución del daño excitotóxico inducido por el QUIN en las neuronas espinosas medianas, cuantificamos el número de células estriatales positivas a FJ-B, a los 7 días después de la inyección de QUIN en el cuerpo estriado (**Figura 7A**) (Ehrlich, 2012). El FJ-B es un derivado de la fluoreceína polianiónica, el cual tiene alta afinidad por productos poliamínicos cargados positivamente, que aparecen en la degeneración celular. Aunque el mecanismo de acción del FJ-B no se sabe con exactitud, se ha observado que ciertas poliaminas tienen una fuerte atracción electrostática a este compuesto, entre las cuales destacan la aminopropilbutanediamina (espermidina), el aminobutano (putrescina) y el diaminopentano (cadaverina). Cabe destacar, que el FJ-B como marcador de degeneración neuronal, tiene la cualidad de marcar daño neuronal total, es decir que marca daño en el cuerpo celular, dendritas, axones y axones terminales.

En este estudio, encontramos que en el grupo QUIN, se observan numerosas células positivas a FJ-B en el sitio ipsilateral a la lesión a los 7 días de la infusión (**Figura 7B**). Este patrón, también se ha observado con la administración de otros agonistas de los receptores NMDA, como el ácido kaínico el cual genera también numerosas neuronas positivas a FJ-B en varias regiones del cerebro tales como el hipocampo, el tálamo medio, el núcleo central de la amígdala y el estriado (Schmued & Hopkins, 2000). Reportes previos indican que la infusión de dosis más bajas de QUIN (60 nmol) también generan gran cantidad de células positivas a FJ-B un día posterior a la infusión (Ryu et al., 2007), sugiriendo que el daño ocasionado por el QUIN ocurre a tiempo cortos y que cuyos efectos tóxicos continúan y son apreciables a los 7 días de la infusión, tal como se aprecia

en nuestros resultados. También sugiere que cualquier medida protectora tiene que actuar de forma rápida y eficiente y/o mantener sus efectos protectores por un tiempo más prolongado. En reportes recientes, se ha visto que la CUR administrada durante 10 días antes del reto tóxico, disminuye el número de células positivas a FJ-B, a los días 1 y 3 después de la lesión con QUIN, sugiriendo que este polifenol de cierta forma, le adjudica a la célula un sistema de protección que sobrepasa el tiempo de permanencia del compuesto en el animal, evitando que las neuronas se degeneren rápidamente tras la infusión con QUIN (Carmona-Ramirez et al., 2013). En nuestro estudio, encontramos una sustancial disminución en el número de células positivas a FJ-B tras el tratamiento con CUR a los 7 días de la infusión (**Figura 7**). Es sabido que el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la sobreproducción de EROs, como consecuencia de la infusión con QUIN, son eventos que suceden en tiempos cortos, que generan cambios severos y condiciones extremas en el ambiente celular y que finalizan con la muerte de la célula. Por lo que la CUR probablemente, es capaz de inducir un sistema de protección celular que evite que detenga la degeneración celular, ya que la muerte neuronal ocurre en gran medida a los pocos días del daño excitotóxico. Esta reportado, que el porcentaje de células muertas en los primeros días de la infusión con QUIN, es considerable (> 50%), y que a los siete días, es de casi la totalidad de la población celular (> 90 %) (Colín-González et al., 2013).

8.4. La CUR incrementa los niveles de Nrf2 en fracciones nucleares de estriado de rata: Incremento observado principalmente en neuronas.

Una vez que observamos una protección celular, derivada del tratamiento post-lesión con CUR, la cual se ve reflejada en una mejoría durante el reto motor, nos interesó averiguar el mecanismo por el cual se genera dicho efecto citoprotector.

Sabiendo que la homeostasis del equilibrio redox es crucial y determinante en la supervivencia de las células en el cerebro, ante los procesos oxidativos basales (en condiciones fisiológicas) y principalmente ante cambios extremos en su microambiente en respuesta a estímulos oxidantes agudos (como podría ser el generado por el QUIN). Nos

interesó averiguar cómo se comportaba el factor de transcripción Nrf2 (un factor orquestador de la maquinaria antioxidante de la célula a corto y a largo plazo) ante un desbalance oxidante imperante ocasionado por la infusión con QUIN. Partimos del antecedente de que cuando se administra la CUR en dosis consecutivas (400 mg/kg) previo al reto excitotóxico, se incrementan los niveles de Nrf2 en las fracciones nucleares del estriado (Carmona-Ramírez et al., 2013), por lo que determinamos los niveles de Nrf2 en fracciones nucleares 7 días después de la infusión con QUIN, encontrando un incremento significativo en los niveles del factor Nrf2 en el grupo QUIN+CUR en comparación al grupo QUIN. (**Figura 8**). Se ha sugerido que la CUR induce la activación de Nrf2, por medio de un cambio en el estado redox de los residuos de cisteína C273 y C288 en el dominio IVR de la proteína keap1 (proteína represora), lo que explicaría el aumento observado en las fracciones nucleares en el estriado de rata. Ahora bien, se ha visto que hay un aumento de Nrf2 en las fracciones nucleares a tiempos más cortos (30 min y 120 min), después de la infusión intraestriatal (Carmona-Ramírez et al., 2013). Observamos en el grupo QUIN+CUR un aumento significativo en los niveles de Nrf2 a los 7 días del reto excitotóxico con QUIN, lo que indica que la CUR es capaz de establecer una defensa antioxidante sostenida durante los 7 días (24 h después de la última dosis de CUR), que probablemente esté relacionada con la preservación de la integridad celular a lo largo del evento excitotóxico. Cabe mencionar, que existe un balance dinámico entre las formas activa e inactiva de Nrf2 en condiciones fisiológicas, subsistiendo tanto en citoplasma como en núcleo, altamente sensible a los cambios oxidativos del microambiente celular, por lo que la forma en la que la CUR induce su translocación nuclear posiblemente dependa de otras señales o moléculas involucradas en la regulación de la vía Nrf2/ARE, mismas que faltan por estudiar (Jain et al., 2005; Li et al., 2006; Chen et al., 2009; Komatsu et al., 2010; Dhakshinamoorthy et al., 2005).

El daño celular generado por el QUIN a los 7 días es producto de los cambios oxidativos abruptos generados en las primeras horas de su administración, acompañado de una serie de eventos bioquímicos que se ven afectados a lo largo de los 7 días, dando como resultado el deterioro celular. Se ha visto que tanto a tiempos cortos (30 min después de

la infusión con QUIN), así como a tiempos largos (7 días), la CUR es capaz de incrementar los niveles de Nrf2, sugiriendo que el importe de Nrf2 al núcleo, promovido por la CUR es un proceso que actúa de forma eficaz y muy sensible tanto a cambios ligeros y abruptos en el estatus redox de la célula, sugiriendo a la CUR como “apoyador” en este evento.

El mecanismo por el cual el QUIN ejerce esta disminución no se sabe hasta el momento. Sin embargo, las condiciones oxidativas que genera el QUIN pueden ser tan hostiles para la célula, que de cierta forma impide la translocación de Nrf2 al núcleo. Si bien, se sabe que ante un aumento de especies de EROs, se induce la activación de Nrf2, es lógico esperar que tras el ambiente oxidante generado por el QUIN, se vean aumentados los niveles de Nrf2 en el núcleo. Sin embargo, esto no se ve en este trabajo, ni en estudios previos. Otra posibilidad implica la carencia de un ambiente oxidante a los 7 días, por lo que tal vez el factor Nrf2 no necesite translocarse al núcleo. Por lo tanto, hacen falta más estudios para resolver este paradigma.

8.5. Dosis diarias de CUR incrementan los niveles de GSH en el estriado de rata

Disturbios en la homeostasis del GSH están implicados en la etiología y la progresión de numerosos padecimientos, incluyendo el cáncer, procesos inflamatorios y las enfermedades neurodegenerativas (Aoyama et al., 2008). Como hemos mencionado anteriormente, el estrés oxidante juega un papel crucial en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, por lo que la concentración de GSH en el cerebro está comprometida a cambios abruptos en los niveles de estrés oxidante celular. En nuestro estudio los niveles de GSH disminuyeron significativamente (30.5%) a los 7 días de la infusión con QUIN comparado con el grupo SHAM (**Figura 11**), lo que es consistente con informes previos, en los que los niveles de GSH disminuyeron un 30% a una semana post-lesión (Cruz-Aguado et al., 2000). Se ha reportado que el QUIN causa un incremento de EROs a tiempos cortos, mismo que se ha asociado con una disminución en los niveles de GSH. En conjunto estos resultados demuestran que los niveles de GSH determinan la presencia de estrés oxidante en el estriado. Debido a que el estriado recibe inervaciones glutamatérgicas de tres diferentes zonas, la concentración extracelular de glutamato debe permanecer estrictamente regulada, al igual que la del neurotransmisor más abundante

en el estriado, el GABA. El QUIN como agonista de los receptores NMDA, causa neurodegeneración de esta zona en específico, mientras que se ha visto que en hipocampo y corteza los niveles de GSH se ven inalterados (Cruz-Aguado et al., 2000).

El tratamiento con CUR (grupo QUIN+CUR) mantuvo los niveles de GSH semejantes a los del grupo SHAM hasta el día 7 (**Figura 11**). Esta capacidad de mantener la concentración de GSH a pesar de la infusión con QUIN, puede estar relacionada a la capacidad de la CUR para incrementar los niveles de Nrf2. Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de GSH dependen de: su síntesis, su regeneración y de su consumo. La síntesis del GSH depende de la actividad de la γ -GCL, enzima regulada por el factor Nrf2, la cual cataliza la unión del glutamato a la cisteína, siendo el paso limitante en la síntesis del GSH. En este estudio se encontró que el tratamiento con CUR incrementó los niveles de la unidad catalítica de esta enzima (γ -GCLc) a los siete días (**Figura 9**), indicando que la tasa de síntesis de GSH podría estar elevada durante ese periodo aunque aún es necesario evaluar la actividad de esta enzima. Es importante mencionar que la expresión de la enzima GS que concluye la síntesis del GSH, al unir glicina al dipeptido γ -glutamil cisteína, también está regulada por la vía Nrf2/ARE. Se ha observado que esta enzima se induce tras el tratamiento con t-BHQ, un conocido inductor del factor Nrf2 (Lee et al., 2003). El efecto de la CUR como antioxidante indirecto (inductor de Nrf2) probablemente podría también sobre-expresando esta enzima, Sin embargo hace falta evaluarlo. Se ha reportado, que Nrf2 controla la expresión de algunos transportadores que importan materiales requeridos para la síntesis del GSH, como el EAAT3, el cual transporta cisteína dentro de la neurona (Escartin et al., 2011). Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de acción de la CUR posiblemente está relacionado con la inducción del factor Nrf2 (**Figura 8**) y con el aumento en los niveles de GSH (**Figura 11**), una vez que estos disminuyeron tras la infusión del QUIN. Este aumento en los niveles de GSH, puede deberse como mencionamos previamente, al aumento en la cantidad de la γ -GCLc, aunque esto aún debe ser comprobado, o bien a la regulación coordinada de las proteínas relacionadas con la regeneración del GSH en su forma reducida, como se detalla a continuación.

8.6. La CUR incrementa los niveles de proteína y la actividad de las enzimas de fase II reguladas por la vía Nrf2/ARE en estriado de rata

El GSH participa en numerosos procesos celulares, ejerciendo un importante papel en los sistemas antioxidantes del SNC. Es por eso que cambios en sus niveles tienen un efecto determinante sobre el equilibrio redox de la célula, el cual es modulado por el factor de transcripción Nrf2. Está bien establecido que este factor rige la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis del GSH (como se mencionó anteriormente); pero adicionalmente, también controla la expresión de las enzimas encargadas de regenerar los niveles de GSH, como son la GR, la GPx y la G6PD, manteniendo así un balance óptimo entre su forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG), según la demanda celular redox (Lee et al., 2003). En este estudio encontramos que el tratamiento con CUR incrementó la cantidad de proteína de la GPx y de la GR y la actividad enzimática de la GPx, la GR y la G6PD a los 7 días de la infusión con QUIN (grupo QUIN+CUR) (**Figura 10**), sugiriendo que el aumento observado en los niveles de GSH a los 7 días después de la infusión con QUIN, posiblemente se deba a la capacidad de la célula para regenerar la cantidad de GSH una vez que este ha sido oxidado o a su falta de consumo.

La disminución en los niveles de GSH ocasionada por el QUIN, podría deberse a la sobreproducción de EROs, lo que podría exceder la capacidad del GSH para neutralizar los radicales libres, llevando a la lipoperoxidación y destrucción de la membrana celular, en cuyo caso, los radicales libres actúan de forma directa con el GSH (disminuyendo su concentración) y oxidándolo a GSSG (aumentado su concentración). Se ha reportado que a las 2 h de la infusión del QUIN los niveles de GSSG aumentan, mientras que los de GSH disminuyen (Rodríguez-Martínez et al., 2000). La CUR al incrementar la actividad (**Figura 10B**) y cantidad de proteína de la GR (**Figura 9B**), podría ser la responsable de restablecer los niveles del GSH tras estos eventos, como lo sugieren los resultados obtenidos. Por otra parte, con el restablecimiento en los niveles de la forma reducida del glutatión, también se favorece la acción de la GPx, al utilizar el GSH como principal sustrato, para la remoción de especies oxidativas como el H₂O₂ o los lipoperóxidos, ya que la CUR incrementó la actividad de la GPx, tras la infusión con QUIN (grupo QUIN+CUR) (**Figura 10A**).

Como consecuencia al aumento en la actividad de la GPx, se podría estar evitando que peróxidos orgánicos tal como el H₂O₂, reaccionen y se conviertan en especies más reactivas (OH[·]) o difundir al interior de otros compartimentos celulares, comprometiendo su integridad, Sin embargo hacen falta más estudios para confirmar esto.

Debido a los acontecimientos nocivos para la célula, el hecho de que la CUR cause un aumento en la cantidad y en la actividad de la GR y GPx, podría ser una herramienta útil para aumentar los niveles de GSH, una vez que estos disminuyeron como consecuencia de los mecanismos degenerativos de las células estriatales.

Es importante señalar, que en la reducción del GSSG (proceso catalizado por la GR), se consume NADPH como coenzima, por lo que es necesario mantener niveles óptimos de este cofactor durante el evento oxidante. En este trabajo se encontró que la CUR incrementó la actividad de la enzima G6PD (**Figura 10D**), la cual produce NADPH como producto principal de su acción catalítica. Sin embargo, el NADPH utilizado por la GR, también podría derivarse de la acción catalítica de otras enzimas, por ejemplo de la enzima málica que también produce NADPH, y que su expresión también es regulada por la vía Nrf2/ARE (Thimmulappa et al., 2002).

El incremento observado en la actividad de la G6PD probablemente es parte de un sistema regulado y regido por los cambios en la homeostasis del GSH, como producto de los requerimientos celulares ante el reto oxidante generado por el QUIN. También se ha observado que la inducción de la G6PD reduce el daño excitotóxico ocasionado por la 6-OHDA, un modelo de la enfermedad de Parkinson (Reiter, 1999). Sin embargo, también se ha visto que la actividad enzimática de la G6PD varía en otras enfermedades cerebrales. En análisis *post-mortem* de cerebros de pacientes con Alzheimer, se encontró que la actividad de la G6PD se encontraba elevada, hasta 6 veces más que lo observado en los pacientes control, relacionándolo principalmente con el elevado metabolismo de peróxidos en el cerebro (Martins et al., 1986). Estos datos sugieren que hacen falta más estudios para elucidar los cambios en la actividad de la G6PD en la degeneración celular de diferentes patologías cerebrales.

Finalmente, las reacciones de desintoxicación de compuestos electrofílicos, son de gran importancia para un buen funcionamiento celular, y como ejemplo está la reacción catalizada por la GST. Esta enzima también está implicada en la homeostasis del GSH, ya que utiliza al GSH como principal sustrato y cuya actividad está comprometida y condicionada a los niveles óptimos de GSH. En este trabajo se encontró que la CUR incrementó la actividad de la GST, ante la disminución observada con el QUIN (grupo QUIN+CUR) (**Figura 10**), sugiriendo probablemente que este aumento puede deberse fundamentalmente a los adecuados niveles de GSH en la célula a los 7 días de la infusión con QUIN (**Figura 11**). Cabe mencionar, que la disminución en la actividad de la GST, no es tan pronunciada como la que se aprecia en la actividad de las otras enzimas analizadas en esta tesis. Por otra parte, en algunos reportes mencionan un aumento en la actividad de la GST tras la infusión con QUIN (36.8 nmol) en corteza e hipocampo a las 24 h, lo que se atribuyó a la capacidad de las células de desintoxicar productos de la lipoperoxidación (4-HNE) causada por el QUIN (Vandresen-Filho et al., 2007).

En resumen, en este estudio reportamos la capacidad de la CUR para inducir y activar la vía Nrf2/ARE, regulando la expresión de las proteínas de fase II. Esta inducción podría estar íntimamente relacionada con el aumento en los niveles de GSH en el estriado, quizá debido a un aumento en la cantidad de proteína de la enzima que limita su síntesis (γ -GCL) y a un aumento en la actividad y la cantidad de las proteínas encargadas de su regeneración (GR, GPx, G6PD), las cuales trabajan de forma coordinada y conjunta para proteger a la célula ante los desafíos oxidantes. La adecuada función de estas enzimas (todas reguladas por Nrf2) probablemente es parte del mecanismo que bloquea los efectos neurotóxicos inducidos por el QUIN.

9. CONCLUSIONES

- El tratamiento con CUR disminuye las alteraciones en la valoración motora inducidas con el QUIN a los 7 días de su administración.
- El tratamiento con CUR disminuye las alteraciones histológicas en las células del estriado inducidas con el QUIN a los 7 días de su administración.
- El tratamiento con CUR evita la disminución de Nrf2 inducida con el QUIN a los 7 días de su administración, manteniendo los niveles de Nrf2 cercanos a los del grupo SHAM.
- El tratamiento con CUR aumentó los niveles de proteínas relacionadas al metabolismo del GSH, después de la infusión con QUIN.
- El efecto protector de la CUR ante las alteraciones inducidas con el QUIN podría estar asociado con el incremento en los niveles de Nrf2 y con la regulación de la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis y regeneración del GSH.
- Nuestros resultados sugieren a la CUR como una posible herramienta terapéutica ante la degeneración estriatal inducida por eventos excitotóxicos/pro-oxidantes.

10. REFERENCIAS

Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Floriano-Sánchez E, Barrera D, Santamaría A, Sánchez-González DJ, Pérez-Severiano F, Pedraza-Chaverrí J, Jiménez PD. 2007. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 28(6):1200-7.

Ahmad N, Umar S, Ashafaq M, Akhtar M, Iqbal Z, Samim M, Ahmad FJ. 2013. A comparative study of PNIPAM nanoparticles of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin and their effects on oxidative stress markers in experimental stroke. *Protoplasma*. 250(6):1327-38.

Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*. 4(6):807-18.

Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. 2008. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*. 108(3):227-38.

Arun N, Nalini N. 2002. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 57(1):41-52.

Athar M, Iqbal M. 1998. Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis*. 19:1133-9.

Bains JS, Shaw CA. 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev*. 25(3):335-58.

Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. 2011. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One*. 6(10):e26012

Basli A, Soulet S, Chaher N, Mérillon JM, Chibane M, Monti JP, Richard T. 2012. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev*. 2012:805762.

Basten GP, Bao Y, Williamson G. 2002. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*. 23(8):1399-404.

Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*. 321(6066):168-71.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(7):517-29

Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 134(3):707-16.

Braidy N, Grant R, Adams S, Brew BJ, Guillemin GJ. 2009. Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res*. 16(1):77-86.

Braidy N, Grant R, Adams S, Guillemin GJ. 2010. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J*. 277(2):368-82.

Brigelius-Flohé R. 1990. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 27(9-10):951-65.

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(3):285-96.

Butcher SP, Hamberger A. 1987. In vivo studies on the extracellular, and veratrine-releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentation and kainic acid lesion. *J Neurochem*. 48(3):713-21.

Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem*. 250:5475-80.

Carmona-Ramírez I, Santamaría A, Tobón-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, González-Herrera IG, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD. 2013. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem.* 24(1):14-24.

Chen W, Sun Z, Wang XJ, Jiang T, Huang Z, Fang D, Zhang DD. 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell.* 34(6):663-73.

Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverrí J. 2006. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Invest Clín.* 58(4):350-8.

Choi-Lundberg DL, Lin Q, Schallert T, Crippens D, Davidson BL, Chang YN, Chiang YL, Qian J, Bardwaj L, Bohn MC. 1998. Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol.* 154(2):261-75.

Colín-González AL, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas ME, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J, Barrera-Oviedo D, Maldonado PD. 2013. Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative damage induced in an excitotoxic/pro-oxidant model in the rat striatum. *Neuroscience.* 231:91-101.

Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP. 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev.* 47(2):271-330.

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. 2008. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology.* 246(1):24-33.

Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134):689-95.

Cruz-Aguado R, Francis-Turner L, Díaz CM, Antúnez I. 2000. Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem Int.* 37(1):53-60.

Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK. 2005. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem.* 280(17):16891-900.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 1999. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis.* 20(5):911-4.

Ehrlich ME. 2012. Huntington's disease and the striatal medium spiny neuron: cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of disease. *Neurotherapeutics.* 9(2):270-84.

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 30(4):379-87.

Dorado-Martínez C, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM.* 46(6):229-35.

Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62(6):649-71.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95.

Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. 2010. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 103(11):1545-57.

Escartin C, Won SJ, Malgorn C, Auregan G, Berman AE, Chen PC, Déglon N, Johnson JA, Suh SW, Swanson RA. 2011. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. *J Neurosci.* 31(20):7392-401.

Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res.* 39(3):265-76.

Fan J, Hu Z, Zeng L, Lu W, Tang X, Zhang J, Li T. 2008. Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Int J Dev Neurosci.* 26(6):523-34.

Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M. 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 79(3):136-71.

Garthwaite G, Garthwaite J. 1987. Quinolinate mimics neurotoxic actions of N-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices. *Neurosci Lett.* 79(1-2):35-9.

Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. 2004. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med.* 8(2):201-12.

Glock GE, Mclean P. 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J.* 55(3):400-8.

González-Cortés C, Salinas-Lara C, Gómez-López MA, Tena-Suck ML, Pérez-De La Cruz V, Rembao-Bojórquez D, Pedraza-Chaverrí J, Gómez-Ruiz C, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A. 2008. Iron porphyrinate Fe(TPPS) reduces brain cell damage in rats intrastrially lesioned by quinolinate. *Neurotoxicol Teratol.* 30(6):510-9.

Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. 2012. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chem Biol Interact.* 195(2):154-64.

Greenamyre JT. 1986. The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch Neurol.* 43(10):1058-63.

Grynkiewicz G, Ślifirski P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(2):201-12.

Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 17(3):455-61.

Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. 2005. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia.* 49(1):15-23.

Gunter TE, Pfeiffer DR. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 258(5 Pt 1):C755-86.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249:7130-9.

Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97(6):1634-58.

Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med.* 33(6):774-97.

Hissin PJ, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74(1):214-26.

Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108.

Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig Dis Sci.* 2005 Nov;50(11):2191-3.

Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK. 2005. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem.* 280(32):29158-68.

Janáky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS. 2000. Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochem Res.* 25(9-10):1397-405.

Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG. 1999. H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *J. Am. Chem. Soc.* 121:9677-9681

Jurenka JS. 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 14(2):141-53.

Klatt P, Lamas S. 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 267(16):4928-44.

Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 26(1):221-9.

Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6):620-50.

Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 12(3):213-23.

Koppenol WH. 2001. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep.* 6(4):229-34.

Kurien BT, Scofield RH. 2003. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods.* 274(1-2):1-15.

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 278(14):12029-38.

Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR, Murphy TH, Raymond LA. 2003. Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiol Aging.* 24(8):1113-21.

Li W, Yu SW, Kong AN. 2006. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem.* 281(37):27251-63.

Lipton SA, Nicotera P. 1998. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium.* 23(2-3):165-71.

Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146(1):3-15.

Maldonado PD, Cháñez-Cárdenas ME, Barrera D, Villeda-Hernández J, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is involved in the neuronal death induced by quinolinic acid in rats. *Neurosci Lett.* 425(1):28-33.

Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2010. NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res.* 88(3):620-9.

Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 279(10):8919-29.

Martins RN, Harper CG, Stokes GB, Masters CL. 1986. Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *J Neurochem.* 46(4):1042-5.

Mattson MP. 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 6(3):337-50.

McKenna MC. 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res.* 85(15):3347-58.

McNaught KS, Brown GC. 1998. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. *J Neurochem.* 70(4):1541-6.

Migliore L, Coppedè F. 2009. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res.* 674(1-2):73-84.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 8(1):95-108.

Mizuno K, Kume T, Muto C, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Sugimoto H, Akaike A. 2011. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)--antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J Pharmacol Sci.* 115(3):320-8.

Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Aldinio C. 1984. The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett.* 47(1):51-5.

Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258(5082):597-603.

Nakamura T, Gu Z, Lipton SA. 2007. Contribution of glutamatergic signaling to nitrosative stress-induced protein misfolding in normal brain aging and neurodegenerative diseases. *Aging Cell.* 6(3):351-9.

Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P. 1996. Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience.* 73(1):185-200.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284(20):13291-5.

Nicotera P, Lipton SA. 1999. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19(6):583-91.

Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):37-42.

Norman AB, Norgren RB, Wyatt LM, Hildebrand JP, Sanberg PR. 1992. The direction of apomorphine-induced rotation behavior is dependent on the location of excitotoxin lesions in the rat basal ganglia. *Brain Res.* 569(1):169-72.

Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. 1999. *Enfermedades neurodegenerativas, mecanismos celulares y moleculares.* Fondo de Cultura Económica. Mexico.

Paxinos G & Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Press.

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience.* 135(2):463-74.

Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. 1998. *Prog Neurobiol.* 56(3):359-84.

Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233:357-63.

Ren J, Fan C, Chen N, Huang J, Yang Q. 2011. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats. *Neurochem Res.* 36(12):2352-62.

Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL. 2005. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2(2):131-6.

Rios C, Santamaria A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res.* 16(10):1139-43.

Rosa AO, Rapoport SI. 2009. Intracellular- and extracellular-derived Ca (2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 1791(8):697-705.

Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. 2009. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 9(7):763-77.

Ryu JK, Tran KC, McLarnon JG. 2007. Depletion of neutrophils reduces neuronal degeneration and inflammatory responses induced by quinolinic acid in vivo. *Glia*. 55(4):439-51.

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(12):2693-6.

Santamaría A, Ríos C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett*. 159(1-2):51-4.

Santamaría A, Ríos C, Solís-Hernández F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J. 1996. Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*. 35:23-8.

Schliebs R. 2004. Molecular mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection-- experimental approaches and the diseased brain. *Int J Dev Neurosci*. 22(7):441-2.

Schmued LC, Hopkins KJ. 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*. 874(2):123-30.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 267(16):4904-11.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. 2010. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 90(2):230-45.

Schwarcz R, Tamminga CA, Kurlan R, Shoulson I. 1988. Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann Neurol.* 24(4):580-2.

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 15(6):252-9.

Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. 2005. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 41(13):1955-68.

Shehzad A, Lee J, Lee YS. 2013. Curcumin in various cancers. *Biofactors.* 39(1):56-68.

Sheldon AL, Robinson MB. 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 51(6-7):333-55.

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev.* 45(3):250-65.

Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. 2010. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing.* 7(1):1.

Silva-Islas C, Santana RA, Colín-González A, Maldonado PD. 2012. Nrf2 Activation, an Innovative Therapeutic Alternative in Cerebral Ischemia. Balestrino M. *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke.* Publisher: InTech.

Sims NR, Zaidan E. 1995. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(6):531-50.

Stone TW. 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol.* 64(2):185-218.

Stone TW, Behan WM, MacDonald M, Darlington LG. 2000. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Amino Acids*. 19(1):275-81.

Sumimoto H. 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*. (13):3249-77.

Syntichaki P, Tavernarakis N. 2003. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci*. 4(8):672-84.

Tapia R, Corona JC. 2005. Neurodegeneration Mechanisms. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXIX. 17-27.

Talalay P. 2000. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*. 12(1-4):5-11.

Tan L, Yu JT, Tan L. 2012. The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: mechanistic and therapeutic considerations. *J Neurol Sci*. 323(1-2):1-8.

Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F. 1999. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int*. 34(1):23-31.

Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O. 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat*. 4:150.

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 62(18):5196-203.

Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. 2011. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)*. 76(4):407-22.

Ting KK, Brew BJ, Guillemin GJ. 2009. Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 6 (36):1-13.

Ung VY, Foshaug RR, MacFarlane SM, Churchill TA, Doyle JS, Sydora BC, Fedorak RN. 2010. Oral administration of curcumin emulsified in carboxymethyl cellulose has a potent anti-inflammatory effect in the IL-10 gene-deficient mouse model of IBD. *Dig Dis Sci.* 55(5):1272-7.

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

Vandresen-Filho S, de Araújo Herculano B, Franco JL, Boeck CR, Dafre AL, Tasca CI. 2007. Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1184:38-45.

Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. 2013. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov.* 12(1):64-82.

Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. 2008. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life.* 60(9):575-90.

Woodlee MT, Asseo-García AM, Zhao X, Liu SJ, Jones TA, Schallert T. 2005. Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. *Exp Neurol.* 191(2):310-7.

Xie C, Lovell MA, Markesbery WR. 1998. Glutathione transferase protects neuronal cultures against four hydroxynonenal toxicity. *Free Radic Biol Med.* 25(8):979-88.

Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. 2009. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm.* 116(11):1403-9.

Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 100:30-47.