



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**INDUCCIÓN DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE VÍA Nrf2 FRENTE
A LA TOXICIDAD DEL MPP+, EN ASTROCITOS PROVENIENTES
DE RATAS DE DIFERENTES EDADES**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de Doctorado en Biología Experimental

P R E S E N T A

M.B.E. Adriana Alarcón Aguilar

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Abel Santamaría Del Ángel

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

México D.F., 25 de Febrero del 2014

COMITÉ TUTORAL

INVESTIGADORES:

CODIRECTOR

Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Investigador Titular C de Tiempo Completo
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa
Depto. de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Tel. (5255) 5804-4732
Fax: (5255) 5804 4727
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

CODIRECTOR

Dr. Abel Santamaría Del Ángel
Investigador en Ciencias Médicas F de Tiempo Completo
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez
Dirección de Investigación
Lab. Aminoácidos Excitadores
Tel. (5255) 56063822 (ext.2013)
E-mail: absada@yahoo.com

ASESOR

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Investigador Titular C de Tiempo Completo
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Autónoma de México
División de Neurociencias
Tel. (5255) 56225616
E-mail: jmoran@ifc.unam.m

Este trabajo fue realizado en:

- El Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
- La División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México
- El Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía *Manuel Velasco Suárez*

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa está avalado como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACYT, con número de registro UAMI 309-0 y con la clave C/PFPN-2002-35-32

Durante el transcurso de mis estudios de Doctorado se me otorgó una beca por parte de CONACYT, con el número de registro 230370.

Los abajo firmantes, miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, aprobaron la tesis titulada: —INDUCCIÓN DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE VÍA Nrf2 FRENTE A LA TOXICIDAD DEL MPP+, EN ASTROCITOS PROVENIENTES DE RATAS DE DIFERENTES EDADESII. Fecha de examen el martes 25 de Febrero del 2014 a las 10:00 am.

México D.F. a 25 de Febrero del 2014

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis:

“INDUCCIÓN DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE VÍA Nrf2 FRENTE
A LA TOXICIDAD DEL MPP+, EN ASTROCITOS PROVENIENTES
DE RATAS DE DIFERENTES EDADES”

Que presentó la
M.B.E. Adriana Alarcón Aguilar

Comité Tutorial:

CODIRECTOR

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

CODIRECTOR

Dr. Abel Santamaría Del Ángel

ASESOR

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade


Jurado:

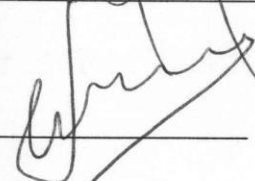
Dra. Anabel Jiménez Anguiano

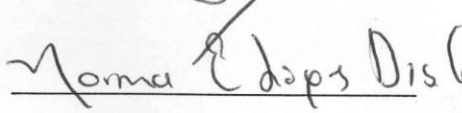
Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

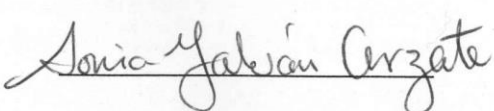
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Dra. Sonia Galván Arzate









En el fondo los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.....



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mina, por sus enseñanzas, apoyo, cariño y por creer en mi trabajo. Es una gran científico. La quiero mucho y admiro!

Al Dr. Abel Santamaría por su confianza, apoyo y enseñanzas.

Al Dr. Julio Morán por su ayuda, su tiempo y sus valiosos comentarios para realizar este trabajo.

A la Dra. Anabel por su apoyo, amistad y confianza en todos estos años de estudio y por sus atinados comentarios para este trabajo.

A La Dra. Norma por su amistad, apoyo y ayuda incondicional para la escritura de este trabajo.

A la Dra. Sonia por sus comentarios muy valiosos y su gran apoyo en este trabajo.

A La Dra. Rocío González Vieira por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

A la Maestra María Guadalupe Domínguez Macouzet por su apoyo y enseñanza.

Al Maestro José L. Ventura-Gallegos por su apoyo y colaboración en este trabajo

Al Maestro Roberto Lazzarini por su amistad, ayuda y apoyo en este trabajo

DEDICATORIAS

A mí Mami por el gran amor, apoyo enseñanzas y ejemplo de que nada es difícil en la vida. Te amo..!

A mí Papá por su apoyo y por sus enseñanzas de vida.

A mí Hermanito Manu por todo el cariño y apoyo siempre. Te quiero mucho!

A mí Abuelito Macario el cual siempre me dio un gran ejemplo, que es el superarse todos los días y el cariño por los libros.

A mí Tía Cande porque siempre tiene un aliciente y por su apoyo incondicional.

A mí Tío Macario por su apoyo y compañía en los grandes momentos de mi vida.

A mis primos Luby, Jonathan, Betito, Rodri, Sandy y Brenda por darme grandes momentos de alegría y cariño.

A mí amiga Viri por su apoyo incondicional, y que estoy segura de que Dios te puso en mi camino. Te quiero mucho!

DEDICATORIAS

A mí amiga Alis que siempre tienes una sonrisa y apoyo incondicional. Te quiero mucho!

A mis grandes compañeros de laboratorio por ser cómplices siempre de mi vida y brindarme su apoyo en las buenas y las malas.

A mí esposo Armando, por su amor el cual agradezco siempre a la vida y por tenerte siempre a mi lado. Te amo y admiro!

A Maty y a Emi que son la razón de mi vida y trabajo. Muchas gracias por sus enseñanzas y alegría que siempre le dan a mi vida. Los amo mis pequeñitos!

Y a Dios por estar siempre a mi lado!

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estrés Oxidante en Enfermedades Neurodegenerativas.....	2
1.2 Enfermedad de Alzheimer (EA) y estrés oxidante.....	3
1.3 Enfermedad de Parkinson y estrés oxidante.....	4
1.4 Neurotóxicos Inductores de Parkinson.....	5
1.5 Modelos animales con MPTP.....	6
1.6 Características histológicas y neuroquímica del modelo	
MPTP.....	7
1.7 Mecanismo de acción del MPTP/MPP+.....	8
1.8 Antioxidantes.....	10
1.9 9 Factor de Transcripción Eritroide tipo 2 (Nrf2).....	12
1.10 Inductores de Nrf2: Terbutil hidroquinona (tBHQ).....	14
1.11 Astrocitos.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	22
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVOS.....	22
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
8.1 Animales.....	24
8.2 Aislamiento y caracterización de astrocitos.....	24
8.3 Tratamientos con los agentes tóxicos.....	26
8.4 Viabilidad celular.....	26
8.5 Funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT).....	27
8.6 Lipoperoxidación (TBARS).....	27
8.7 Determinación de proteínas oxidadas.....	28
8.8 Análisis de proteínas por Western blot.....	28
8.9 Inmunolocalización de Nrf2.....	29
8.10 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética	
(EMSA).....	30

8.11 Determinación del estado redox mediante el Cociente GSH/GSSG.....	31
8.11.1 inación del GSH.....	31
8.11.2 minación de GSSG.....	31
8.12 Análisis estadístico.....	32
9. RESULTADOS.....	33
9.1 Cultivos primarios de astrocitos.....	33
9.2 H ₂ O ₂ como control positivo de daño oxidante.....	35
9.3 Efectos citotóxicos a tiempos largos de exposición al MPP+ y β- amiloide.....	36
9.4 Efectos citotóxicos a tiempos cortos de exposición.....	39
9.5 Experimentos dosis-respuesta con tóxico MMP+ incluyendo astrocitos provenientes de ratas seniles.....	42
9.5.1 Viabilidad.....	43
9.5.2 Funcionalidad Celular.....	45
9.5.3 Daño oxidante a lípidos.....	47
9.5.4 Daño oxidante a proteínas.....	49
9.6 6 Incremento en la expresión de Nrf2.....	51
9.6.1 Viabilidad celular durante el tratamiento con tBHQ.....	51
9.6.2 Expresión de Nrf2 total.....	52
9.7 7 tBHQ induce la translocación nuclear de Nrf2.....	53
9.8 Nrf2 se encuentra unido a su elemento de respuesta en el DNA (ARE) únicamente en tiempos cortos.....	56
9.9 9 Incremento en la expresión de γ-GCS y GST.....	59
9.10 pre-acondicionamiento con tBHQ incrementa los nivel de GSH y protege a los astrocitos de animales viejos de la toxicidad del MPP+.....	61
10. Discusión.....	66
11. Conclusión.....	79
12. Perspectivas.....	80
13. Bibliografía.....	81
14. Publicaciones.....	105

RESUMEN

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar enfermedades neurodegenerativas, y aunque no se conoce totalmente la etiología de éstas, se ha propuesto que una de las causas primarias es el estrés oxidante. Los astrocitos juegan un papel importante en la fisiología del cerebro, respondiendo a estímulos dañinos y activando la astrogliosis, que tiene un papel dual, ya que se asocia a eventos de protección y supervivencia o bien incrementa el daño neurodegenerativo. Como la edad tiene un papel preponderante en los procesos degenerativos, uno de los objetivos iniciales de este trabajo fue determinar si la administración de concentraciones equimolares de dos neurotoxinas: 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+) o el péptido beta-amiloide inducían efectos diferenciales en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de ratas neonatas o adultas, con un énfasis particular sobre el estrés oxidante como fuente potencial del daño.

El factor de transcripción Nrf2 es un regulador central en la respuesta antioxidante y es por ello que se emplean inductores farmacológicos para activarlo e inducir de esta manera protección celular. A la fecha aún se desconoce si los animales viejos son capaces de activar esta respuesta. El objetivo principal del trabajo fue determinar si astrocitos corticales provenientes de ratas seniles respondían al pre-tratamiento con el inductor tBHQ para estimular la vía Nrf2-ARE e inducir una respuesta antioxidante que lograra minimizar el daño frente al tóxico MPP+. Nuestros resultados indican que aunque los astrocitos provenientes de animales adultos y seniles fueron más susceptibles al daño por MPP+ que los de neonatos, cuando se pre-trataron con tBHQ lograron activar a Nrf2, aumentar las enzimas antioxidantes y desarrollar protección. Sin embargo, esto fue únicamente en un cierto rango de concentraciones, por lo que los resultados se discuten en términos de las dosis empleadas para obtener el efecto protector.

SUMMARY

Aging is the main risk factor for numerous neurodegenerative disorders, and even though their accurate etiology is largely unknown, oxidative stress has been proposed as one of the primary causes that links the aging process with the establishment of most neuropathies. Astrocytes play an active role in brain physiology responding to harmful stimuli by activating astrogliosis, which in turn has been associated either with survival or degenerative events. As age plays a critical role in degenerative processes, one of the aims of this work was to determine whether the administration of equimolar concentrations of two neurotoxins: 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) or beta-amyloid peptide (β -amyloid) can induce differential effects on primary astrocytes obtained from newborn or adult rats, with particular emphasis in oxidative stress as a potential source of damage.

Nrf2 is a central regulator of the antioxidant response, and therefore, pharmacological inducers are often used to activate it in order to induce cellular protection. To date, it still remains unknown if cells from aged animals are capable of developing this response. Therefore, the main purpose of this work was to determine if cortical astrocytes derived from old rats are able to respond to tBHQ pre-treatment and stimulate the Nrf2-ARE pathway to induce an antioxidant strategy against MPP⁺ toxicity. Our results show that, although astrocytes from adult and old rats were more susceptible to MPP⁺ toxicity than astrocytes from newborn rats, when pretreated with tBHQ, they were able to activate Nrf2, increasing antioxidant enzymes and developing cellular protection. These results are discussed in terms of the doses used in order to create protective responses.

ABREVIATURAS

Ácido Quinolinico	QUIN
Animales seniles (old astrocytes)	OA
Animales adultas (adult astrocytes)	AA
Animales neonatos (newborn astrocytes)	NA
Enfermedad de Alzheimer	EA
Enfermedad de Huntington	EH
Enfermedad de Parkinson	EP
Enzima γ -glutamyl-cisteina sintetasa	γ -GCS
Enzima GSH-sintetasa	GS
Enzima glutatión sulfidril transferasa	GST
Especies reactivas de nitrógeno	ERN
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Factor de Transcripción Eritroide tipo 2	Nrf2
Formación de Nódulos Neurofibrilares	NTF
N-metil- D-aspartato	NMDA
Nódulos neurofibrilares	NTF
Óxido nítrico	NO•
Oxido Nítrico Sintetasa	NOS
Péptido β -amiloide	Abeta
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂
Peroxinitrito	OONO-
Placas seniles	SP
Proteína precursora del péptido amiloide	PPA
Radical Hidroxilo	OH•
Radical Libre	RL
Terbutil hidroquinona	tBHQ
Sistema Nervioso	SN
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Nervioso Periférico	SNP
Superóxido	O ₂ •-
1-Metil-4- fenilpiridinio	MPP+
1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina	MPTP

1. INTRODUCCIÓN.

El envejecimiento es un proceso natural e irreversible que se caracteriza por la acumulación de daños y la pérdida en la capacidad reparativa de las células y los tejidos a lo largo de la vida de un individuo. El envejecimiento es un fenómeno multifactorial, por lo que resulta importante tratar de entender cómo se desarrolla para así aplicar las medidas necesarias para disminuir el riesgo de adquirir enfermedades asociadas a la edad y para atenuar los daños acumulados durante el transcurso de la vida de un individuo.

Existen diferentes teorías que tratan de explicar el proceso de envejecimiento; sin embargo, una de las más aceptadas es la teoría de los Radicales Libres, postulada por Harman en 1956, la que sugiere que los daños irreversibles y la disminución en las funciones biológicas de los seres vivos son causadas principalmente por el incremento y la acumulación del daño oxidante en las biomoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos (Harman, 1956).

El envejecimiento se ha relacionado con diferentes patologías; especialmente se ha considerado que las personas de edad avanzada son más susceptibles a desarrollar enfermedades neurológicas. Se ha propuesto que el estrés oxidante es la principal causa de estas neuropatías, no solo por el hecho de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) alteran estructural y funcionalmente a las biomoléculas, sino que además, se ha considerado que los daños ejercidos por las ROS son potencialmente inductores de la muerte celular, ya sea por necrosis o por apoptosis (Friedlander, 2003). También se sabe que el sistema nervioso central (SNC) es altamente susceptible al daño por las ROS debido a que: i) presenta altas concentraciones de lípidos y estos son más vulnerables a la oxidación (Adibhatla y Hatcher, 2010); ii) tiene un elevado metabolismo aeróbico que presenta debido al consumo de glucosa, de donde se genera un incremento en la actividad mitocondrial, la cual se ha considerado la principal fuente generadora de ROS (Fernández-Checa et al., 2010); iii) y finalmente, el SNC posee bajos niveles de enzimas antioxidantes, en contraste con la alta actividad de algunas enzimas pro-oxidantes, así como, de la constante auto-oxidación de catecolaminas y del ascorbato.

1.1 Estrés Oxidante en Enfermedades Neurodegenerativas

Cada vez existen más evidencias que relacionan los defectos en la función mitocondrial y el estrés oxidante con la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. Se sabe que la mitocondria contribuye al envejecimiento mediante la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial y la producción de ROS. La generación de estas moléculas a partir del oxígeno molecular es un proceso fisiológico que tiene lugar en las células de todos los organismos aeróbicos. Entre las principales ROS se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se presentan en las células en concentraciones basales del orden nanomolar y micromolar, respectivamente (Dawson y Dawson, 1996). El anión superóxido se forma *in vivo* como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, aunque también puede generarse por la acción de enzimas como la xantina oxidasa. Su reacción con la enzima superóxido dismutasa (SOD) da lugar a la generación de H_2O_2 , una molécula poco reactiva pero con capacidad oxidante. El H_2O_2 puede generarse además por la acción de otras enzimas como la monoamino oxidasa (catabolismo de la dopamina). El H_2O_2 puede reaccionar en presencia de hierro dando lugar a la formación de radicales hidroxilo ($\cdot OH$) mediante la reacción de Fenton. Asimismo, el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar entre sí, en presencia de cationes metálicos, mediante la reacción de Haber-Weiss, generando igualmente radicales hidroxilo, que son especies altamente reactivas y oxidantes (Halliwell 1992; Peuchen et al. 1997). Cuando se incrementa la producción de moléculas oxidantes, o bien se produce una deficiencia en los mecanismos antioxidantes intracelulares, las ROS producidas resultan dañinas para la célula. Esta situación de desequilibrio en la homeostasis redox intracelular-es decir, entre oxidantes y antioxidantes- es lo que se conoce como —estrés oxidante—. Los daños celulares producidos por estas sustancias son de naturaleza variada y afectan a la estructura del ADN, de los lípidos de membrana y de muchas proteínas. En el sistema nervioso central, se ha descrito la implicación de las ROS en los efectos tóxicos y neurodegenerativos que tienen lugar en patologías como la isquemia cerebral o las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Halliwell, 1992; Moro et al., 2005).

1.2 Enfermedad de Alzheimer (EA) y estrés oxidante

En la actualidad, la EA se conoce como la alteración neurodegenerativa más importante relacionada con la edad. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida sustancial y progresiva de la memoria y episodios agudos de demencia, ambos asociados a una degeneración y pérdida paulatina de neuronas, particularmente en la región límbica. En la EA se ha descrito un incremento importante en la peroxidación de lípidos de membrana y un severo daño al ADN en etapas avanzadas de esta enfermedad (Yankner, 1996). Dentro de las características bioquímicas de la EA se incluyen anomalías en las transmisiones glutamatérgicas, colinérgicas, adrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas, además de la activación de vías inflamatorias, oxidativas y hormonales.

El incremento en la lipoperoxidación y sus derivados (4-hidroxinonenal y MDA) están directamente relacionados con la formación de nódulos neurofibrilares (NTF) y de las placas seniles (SP), que son características de la EA. Se conoce también que en esta neuropatía a nivel molecular y celular, la causa primordial del trastorno se relaciona con una acumulación aberrante del péptido β -amiloide (Abeta), la cual es el producto de la ruptura de la proteína precursora del péptido amiloide (PPA). Se ha propuesto que el péptido β -amiloide es el responsable de las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, así como también es un candidato para explicar el origen de las ROS y causar la muerte celular (Mancuso et al., 2007).

Cabe destacar que para el estudio de la EA existen algunos modelos de preparaciones biológicas y animales, uno de ellos es el que emplea al péptido Abeta. Como ya se mencionó, el Abeta es el resultado del procesamiento proteolítico de la PPA por β -amiloide y γ -secretasas, mientras que la PPA de longitud completa parece jugar un papel fisiológico en el transporte axonal. Se ha demostrado por medio de estudios experimentales con Abeta tanto *in vivo* como *in vitro*, que el fragmento responsable de la neurotoxicidad y diversas alteraciones tanto celulares como mitocondriales es el fragmento 25-35. Por ende, el Abeta está implicado en el daño oxidante y la neurotoxicidad (Wilcock et al., 2008).

1.3 Enfermedad de Parkinson y estrés oxidante

La enfermedad Parkinson (EP) es el segundo padecimiento neurodegenerativo más frecuente en las personas de la tercera edad, superado únicamente por la enfermedad de Alzheimer, con una incidencia de 1 en 200 (Schapira y Olanow, 2004).

Las estadísticas oficiales sobre enfermos de Parkinson en México tienen un severo atraso y el dato más reciente es de hace 13 años. En 1997 se estimaba que había entre 500 y 600 mil personas que padecían esta enfermedad; sin embargo, el año pasado, la Asociación Mexicana de Parkinson A.C. reportó que en nuestro país existen al menos dos millones de personas afectadas por este mal.

La EP es una neuropatía que afecta tanto a hombres como a mujeres, y se desarrolla más frecuentemente después de los 50 años de edad. Esta enfermedad fue descrita originalmente por James Parkinson en 1817 y se caracteriza por síntomas tales como bradicinesia (movimiento lento), temblor en reposo y rigidez (Chase et al., 1998; Braak et al., 2004; Jason et al., 2009).

A nivel histopatológico y molecular, la EP se relaciona con un deterioro gradual y progresivo de las neuronas que se localizan en la *sustancia nigra pars compacta* (SNPc) del cerebro, las cuales sintetizan dopamina. Otra característica que se ha encontrado que en cerebros pacientes con EP son inclusiones intracelulares de agregados proteicos enriquecidos en la proteína alfa-sinucleína, también llamados cuerpos de Lewy (Lim et al., 2009 ; Bonifati, 2005; Olanow et al., 2004).

La degeneración de las neuronas dopaminérgicas (NDA) y la consecuente pérdida de dopamina en las terminaciones nerviosas en el cuerpo estriado son aparentemente las responsables de la mayoría de los trastornos del movimiento (Chase et al., 1998; Lee et al., 2010; Simunovic et al., 2010). De hecho, se cree que una de las causas que conducen a una degeneración preferente de las NDA es que precisamente el metabolismo de dicho neurotransmisor conlleva la generación de radicales libres y ROS que acentúan el estrés oxidante en esta población (Barzilai y Melamed, 2003; Dauer y Przedborski, 2003).

Se considera al Parkinson mayoritariamente una enfermedad esporádica asociada al envejecimiento (Aron et al., 2010; Schapira, 2004), aunque también se han encontrado mutaciones responsables de un cierto número de casos de la EP en los genes que codifican la α -sinucleína, la parkina, el DJ-1 o el Nurr-1, entre otros, y que propician el desarrollo de la enfermedad (Aron et al., 2010; Huang et al., 2004). Además, se han detectado algunas mutaciones en el ADN mitocondrial que también podrían estar relacionadas con la aparición de la enfermedad en algunos casos (Smigrodzki et al., 2004).

La etiología de la EP sigue siendo un misterio, mientras que su patogénesis comienza a ser entendida como una cascada de múltiples factores nocivos. La mayoría de las ideas sobre la patogénesis de la EP provienen de investigaciones realizadas en modelos experimentales, especialmente los producidos por diversas toxinas (Bové et al., 2005).

1.4 Neurotóxicos Inductores de Parkinson

Actualmente, para reproducir algunas de las características que semejan los fenómenos que ocurren en diversas neuropatologías, se emplean modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, e involucran el uso de agentes neurotóxicos. El modelo más estudiado y utilizado es el del MPTP/MPP+, por lo que será el utilizado en este trabajo experimental.

El 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es una toxina que genera un modelo de la EP y que ha sido ampliamente utilizado para poner a prueba estrategias protectoras. Este agente neurotóxico se descubrió cuando una gran cantidad de jóvenes adictos a la heroína comenzaron a presentar síntomas de parkinsonismo, lo que se ha denominado como síndrome parkinsoniano, y es caracterizado por temblor, acinesia, rigidez, postura en flexión, alteración de reflejos posturales y tendencia al sigilo. Interesantemente, todos estos signos se revirtieron con la administración de L-dopa o agonistas dopaminérgicos (Langston et al., 1983; Przedborski et al., 2004). Como resultado de los estudios que se realizaron a estos pacientes, se encontró que el responsable de dichos síntomas era el compuesto 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), un metabolito tóxico proveniente del MPTP (Choi et al., 2009).

Ahora se sabe que el MPTP es un compuesto que fácilmente atraviesa la barrera hematoencefálica y es oxidado en las células de la glía, principalmente astrocitos. La enzima responsable de este proceso es la monoamino-oxidasa-B (MAO-B), misma que convierte al MPTP en 1-metil-4-fenil-2, 3-dihidropiridinio (MPDP+), y que a su vez por oxidación espontánea se transforma en 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+). El MPP+ entonces abandona los astrocitos y es selectivamente incorporado a las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT), ejerciendo allí su principal acción neurotóxica a través de la inhibición del complejo I mitocondrial (Przedborski y Vila, 2003; Bohlen y Halbach, 2005). Es por eso que el MPTP se ha utilizado para inducir degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, generando así modelos de la EP en murinos y primates (Tatton et al., 1992; Forno et al., 1993; Muthane et al., 1994; Fornai et al., 2005). Sin embargo, una limitación inicial para el empleo de este y otros modelos fue que estos carecían de los característicos cuerpos de Lewy (Forno et al., 1993), aunque recientemente se ha visto que la infusión continua de dosis más bajas de MPTP durante un largo período sí logra reproducir de una manera íntegra las marcas histopatológicas de la EP (Fornai et al., 2005).

1.5 Modelos animales con MPTP

La neurotoxicidad inducida por el MPTP ha sido demostrada en diversas especies animales, incluyendo macacos, ratones negros (C57) y gatos (Blesa et al., 2010; Subramanian et al., 2010; Haleagrahara et al., 2010). No existe aún una explicación para la diferente vulnerabilidad de las distintas especies animales al MPTP; sin embargo se ha postulado que este hecho puede estar relacionado a diferencias en el metabolismo del MPTP y en la distribución y retención cerebral de su metabolito, el MPP+ (Riachi et al., 1998). A este respecto, para algunos autores la neurotoxicidad del MPTP es dependiente del contenido de neuromelanina, ya que la afinidad del MPP+ por la neuromelanina es muy alta y dicho pigmento está presente en las neuronas dopaminérgicas, mientras que para otros, esta susceptibilidad diferencial está relacionada con la actividad MAO-B a nivel de los capilares cerebrales (Malagelada et al., 2006). Aunque especies animales como la rata son resistentes a la administración

sistémica de MPTP, su metabolito, el MPP+, es una potente neurotoxina que produce la destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la SNPc cuando se administra directamente en el estriado (Kidd et al., 2000). Por lo tanto, es posible que la vulnerabilidad diferencial que presentan las especies animales al MPTP sea dependiente de factores relacionados a la distribución y metabolización cerebral de dicho tóxico (Schildknecht et al., 2009).

En cuanto a las alteraciones conductuales inducidas en este modelo, se ha reportado que una gran variedad de primates no humanos desarrollan también un síndrome parkinsoniano cuando se les administra MPTP. Estos animales muestran una reducción importante de la actividad espontánea, rigidez, bradicinesia y temblor, aunque muy pocos desarrollan el temblor de reposo característico de la EP. Los síntomas parkinsonianos son inicialmente transitorios, pero se hacen permanentes con la administración repetida de la toxina. Los mecanismos implicados en la recuperación espontánea que experimentan estos animales no se conocen, pero pueden estar relacionados con una alteración transitoria de otros sistemas de neurotransmisión diferentes al del nigroestriado (Schulz y Falkenburger, 2004).

1.6 Características histológicas y neuroquímicas del modelo MPTP

Un estudio histopatológico de uno de los individuos que desarrollaron síndrome parkinsoniano tras inyectarse una droga que contenía MPTP, mostró una lesión selectiva de las células dopaminérgicas de la SNPc. Sin embargo, los estudios realizados en primates han demostrado que la lesión inducida por MPTP no afecta de forma exclusiva a esta población neuronal. Diversos autores han demostrado que en macacos adultos, la administración de MPTP induce además una degeneración de las NDA del área tegmental-ventral (ATV) y del *locus coeruleus*, donde se han descrito cuerpos de inclusión eosinofílicos que se asemejan a los cuerpos de Lewy. La degeneración del ATV, aunque en menor grado, es evidente también en los primates jóvenes. Sin embargo, la pérdida neuronal es siempre de mayor intensidad en las NDA de la SNPc (Bezard et al., 2001; Ding et al., 2008).

Desde un punto de vista neuroquímico, también existe una gran similitud entre el parkinsonismo inducido por MPTP y la EP. La acción neurotóxica del MPTP

se caracteriza por una reducción de la concentración de dopamina (DA) y de sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético y el ácido homovanílico, así como una disminución de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa y una alteración en la densidad de receptores DA. A diferencia de lo que sucede en la EP, donde la disminución de DA es más intensa en el putamen que en el núcleo caudado, los primates expuestos de forma crónica a la acción del MPTP muestran una disminución homogénea y no selectiva del contenido de DA estriatal, siendo de igual intensidad en ambas estructuras estriatales. Otras áreas cerebrales con innervación GABAérgicas, como el *nucleus accumbens*, el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral, también son afectadas por MPTP, y la reducción en el contenido de DA es similar a la descrita en estriado (Betarbet et al., 2002; Molinuevo et al., 1999; Wichmann et al., 2003). Por el contrario, los niveles de DA no se alteran en estructuras como el globo pálido lateral y medial, que recibe proyecciones directas de la SN. Las concentraciones de noradrenalina y serotonina en estriado no se modifican con la administración aguda de MPTP. Sin embargo, estos neurotransmisores se reducen de forma significativa en estriado y corteza en los animales tratados de forma crónica con esta neurotoxina. No existe evidencia de que el MPTP induzca alteraciones en los sistemas colinérgico, GABAérgico o glutamatérgico en primates, aunque los niveles de diferentes neuropéptidos y encefalina en el estriado, *sustancia nigra* y pálido están reducidos en animales tratados crónicamente con MPTP. Estas mismas alteraciones han sido descritas en pacientes con EP. Sin embargo, no se conoce si son consecuencia de la degeneración de neuronas que contienen estos péptidos o representan cambios adaptativos a la denervación nigroestriatal (Kliem et al., 2010; Grondin et al., 2008; Leblois et al., 2007; Kuwajima et al., 2007).

1.7 Mecanismo de acción del MPTP/MPP+

Una de las hipótesis propuestas para explicar la muerte neuronal inducida por MPTP sugiere que el daño celular se origina por la producción intraneuronal de radicales superóxido y otros radicales libres citotóxicos que se originan durante la oxidación intracelular del MPP⁺ en cantidades que exceden la capacidad celular para neutralizarlos.

Se ha reportado que en homogenados de cerebro de roedores, el MPTP induce la producción de radicales hidroxilo y acelera la acumulación de lipofucsina, especialmente si el medio carece de vitamina E. Por otro lado, el MPTP y MPP⁺ incrementan la auto-oxidación de la DA, que a su vez genera ROS y disminuye los niveles intracelulares de glutatión (GSH) en roedores, efecto que es bloqueado por antioxidantes como la vitamina E (Ren et al., 2006; Adams et al., 1994; Hadjiconstantinou et al., 1987; Zhang et al., 2010).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado en roedores y primates, que inhibidores del óxido nítrico sintasa (NOS) protegen de forma eficaz a la lesión de NDA inducida por el MPTP. La NOS es un enzima dependiente de calcio cuya activación se produce por estimulación de receptores glutamatérgicos para N-metil-D-aspartato (NMDA). De su activación depende la síntesis de óxido nítrico, la cual a su vez puede producir una inhibición directa de la cadena respiratoria mitocondrial, o dar lugar a la formación de peroxinitritos, de manera que el debate sobre la participación del estrés oxidante en este fenómeno sigue vigente (Kurosaki et al., 2002; Schulz et al., 1997).

Otra de las hipótesis de toxicidad del MPTP se ha centrado en los hallazgos de que el MPP⁺ es un potente inhibidor de la respiración mitocondrial. Nicklas y colaboradores fueron los primeros en describir que en condiciones *in vitro*, el MPP⁺, a altas concentraciones (1 mM), produce una inhibición completa de la oxidación de los sustratos piruvato/malato y glutamato/malato, ambos ligados a NAD⁺, mientras que *in vivo*, en condiciones que requieren concentraciones mucho mayores del agente tóxico (10 mM) para que tenga lugar la inhibición de la cadena transportadora de electrones, se ha comprobado que el MPP⁺ es transportado desde el citoplasma al interior de la mitocondria en contra de un gradiente dependiente de ATP. Los efectos del MPP⁺ sobre las mitocondrias han sido bien caracterizados. A altas concentraciones, la toxina bloquea la oxidación de la NADH, existiendo una perfecta correlación entre la acumulación de MPP⁺ y la disminución de ATP. Por otro lado, la inhibición del transporte de electrones mitocondrial induce una disminución en la producción de ATP celular, que a su vez da lugar a una alteración en la organización de los microfilamentos celulares y más importante, provoca una alteración de los potenciales transmembranales y una disminución de glutatión reducido (GSH) extracelular, principal defensa de la célula frente al estrés oxidante. Así mismo,

la inhibición del complejo I mitocondrial genera ROS, por lo que no puede excluirse la posibilidad de que ambas hipótesis estén relacionadas (Nicklas et al., 1985, 1987, 1992; Petit-Paitel et al., 2009; Anantharam et al., 2007; Miyako et al., 1999; Fukae et al., 2007).

1.8 Antioxidantes

Por su parte, las células poseen mecanismos de defensa antioxidante que les permiten inactivar a los radicales libres y quitarles su capacidad oxidante. Uno de los mecanismos más eficaces de inactivación corresponde a la enzima Superóxido dismutasa (SOD), la cual transforma al superóxido en H_2O_2 . Además acopladas a este sistema de inactivación de las ROS, las catalasas (CAT) convierten el H_2O_2 en H_2O y O_2 ; estas enzimas se encuentran en grandes cantidades en organelos sub-celulares como los peroxisomas; sin embargo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico contienen CAT en cantidades muy bajas. Por otra parte, el H_2O_2 intracelular no puede ser eliminado a menos que pueda difundir a los peroxisomas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Para deshacerse del H_2O_2 que no logra ser eliminado por las catalasas, las células utilizan otro grupo de enzimas, entre las que destaca la glutatión peroxidasa (GPx) que se encarga de remover al H_2O_2 utilizando al GSH en una reacción oxido-reducción acoplada. La GPx también puede reducir otros peróxidos, como los hidroperóxidos de ácidos grasos. Estas enzimas están presentes en el citoplasma en concentraciones milimolares, y también están presentes en la matriz mitocondrial. La mayoría de los tejidos han mostrado actividad de las enzimas CAT y GPx. Las SOD son enzimas que remueven al radical superóxido, produciendo H_2O_2 como producto final de la dismutación, como se mencionó anteriormente, y han sido identificadas tres isoformas, mismas que están presentes en las células eucarióticas. La isoforma Cu/Zn de la SOD-1 está presente en el citoplasma celular, núcleo y plasma, mientras que la isoforma de SOD-2 que tiene Mn se encuentra localizada principalmente en la mitocondria. En cuanto a los micronutrientes de la dieta, estos también contribuyen en la defensa antioxidante. En particular destacan el β -caroteno o vitamina A, el ácido ascórbico o vitamina C y el α -tocoferol o

vitamina E. Las moléculas solubles en agua como la vitamina C, son conocidos como potentes atrapadores de radicales libres y actúan principalmente en el citoplasma, mientras que las que son solubles en lípidos, como la vitamina E y los carotenos, actúan principalmente en los ambientes hidrofóbicos como las membranas. Elementos como el selenio, el cobre, el zinc y el manganeso son también importantes ya que actúan como co-factores de las enzimas antioxidantes. En particular, el selenio es considerado importante en la protección de las membranas en contra del estrés oxidante, ya que sirve como cofactor de la GPx (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lauterburg et al., 1984; Deneke et al., 1989).

El antioxidante celular más abundante es el tripéptido glutatión: GSH (γ -glutamil-cistein-glicina). El GSH es sintetizado en dos pasos principales: durante el primero, la enzima γ -glutamil-cisteina sintetasa (γ -GCS) forma el enlace γ -peptídico entre el ácido glutámico y la cisteína. El segundo paso está catalizado por la GSH-sintetasa (GS), la cual adiciona el aminoácido glicina. El GSH previene la oxidación de los grupos tioles de las proteínas, reaccionando directamente con las ROS, o indirectamente a través de las glutatión transferasas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lauterburg et al., 1984; Deneke et al., 1989). El GSH es importante ya que es muy versátil; existen diferentes sistemas que lo utilizan para contrarrestar los efectos producidos por el estrés oxidante. En la fase I de detoxificación destaca la GPx, la cual se encarga de transformar el H_2O_2 , mientras que en la fase II de detoxificación destacan principalmente las enzimas que se encargan de transferir grupos tioles a una gran cantidad de moléculas oxidadas, y con ello disminuir la toxicidad de estas, destacando entre estas la glutatión sulfhidrilo transferasa (GST), de la cual existen 5 isoformas descritas. Se trata de una familia de isoenzimas implicadas en fenómenos de detoxificación. De hecho, existe un gran número de evidencias experimentales que indican que estas isoenzimas confieren resistencia ante compuestos carcinogénicos, drogas antitumorales, agentes tóxicos ambientales y estrés oxidante. En este último caso, las GSTs actúan a través de la inactivación de metabolitos que contienen grupos carbonilos, peróxido y epóxido, generados como consecuencia de los impactos oxidantes producidos por los radicales libres (Hayes et al., 2005). Otro importante grupo de enzimas antioxidantes incluye a las tioredoxinas (Trx), que producen en su

reacción final GSH a partir del reciclamiento del GSSG, o moléculas como lípidos y proteínas que han sido glutationalizados. Otra de las ventajas que tiene el sistema antioxidante del GSH es que las moléculas que ya han sido oxidadas a GSSG pueden ser recicladas por sistemas altamente eficientes como la enzima glutatión reductasa (GR), la cual, utilizando NADPH como co-factor, puede convertir al GSSG en 2 moléculas de GSH. Todas estas razones hacen que el sistema del GSH sea el más eficientemente utilizado por las células para contrarrestar el estrés oxidante.

El efecto protector conferido por las altas concentraciones de GSH lo involucra en una gran cantidad de investigaciones en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, en donde se ha investigado la participación de los astrocitos en la protección neuronal, cuando se induce un estado de estrés oxidante. En estos estudios se han analizado los mecanismos de regulación de las enzimas involucradas en la síntesis, reciclamiento y detoxificación antioxidante en las que participa el GSH. La regulación de la expresión de algunas enzimas antioxidantes relacionadas con el sistema del GSH, como lo son la γ -GCS y la GST, también ha sido estudiada. Estas enzimas contienen en su promotor un elemento en —CISII conocido como elemento de respuesta antioxidante (ARE), que es activado por el factor de transcripción nuclear eritroide-2 (NF-E2), conocido como Nrf2, el cual incrementa los niveles de expresión de estas enzimas y con ello favorece la respuesta antioxidante mediada por GSH (Kraft et al., 2004; Lee et al., 2003; Dringen et al., 2000; Johnson et al., 2002)

1.9 Factor de Transcripción Eritroide tipo 2 (Nrf2)

El Nrf2 es un factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés oxidante (fig.1). En condiciones de estrés ausente o —no-estrésII, el Nrf2 es mantenido en niveles bajos debido a la interacción con su regulador negativo Keap 1 (Proteína 1 asociada al elemento Kelch), lo cual permite la formación de un complejo en donde participan proteínas como la E3 ubiquitina ligasa, la Culina 3 (Cul3) y el Ring-Box 1 (Rbx1), lo que facilita la ubiquitinización de Nrf2 (Kobayashi et al., 2004; Zhang et al., 2004). Subsecuentemente, el Nrf2 es degradado por el proteosoma 26S. Cuando las células son expuestas a estrés oxidante o a compuestos electrofílicos, los residuos de cisteínas en las

posiciones C273, C288 y C151 en el represor Keap 1, se S-alquilizan y actúan como sensores de un estado de estrés (Dinkova et al., 2002; Zhang y Hannink, 2003; He y Ma, 2009). Por lo anterior, se ha propuesto que un cambio conformacional en residuos específicos de Keap 1 interfiere en la formación del complejo Keap 1/Cul3-Rbx1/E3 ubiquitina ligasa, impidiendo la ubiquitinización de Nrf2 (Wakabayashi et al., 2004). Consecuentemente, el Nrf2 se fosforila y se transloca al núcleo, formando un dímero con la proteína Maf, lo que le permite unirse a su elemento de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de genes citoprotectores que son responsables de la detoxificación y eliminación de diferentes sustancias citotóxicas. Estos genes incluyen a proteínas que participan en el balance del estado redox basal como la hemo oxigenasa 1 (OH-1) y la tioredoxina reductasa 1(Trx1), enzimas de fase I y II de detoxificación, tan importantes como la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1), la GSTy la γ -GCS, transportadores de xenóbioticos, proteínas asociadas a la resistencia a multidroga (MRP), y otras proteínas de respuesta al estrés (Kensler et al., 2007; Lau et al., 2008; Li y Kong, 2009).

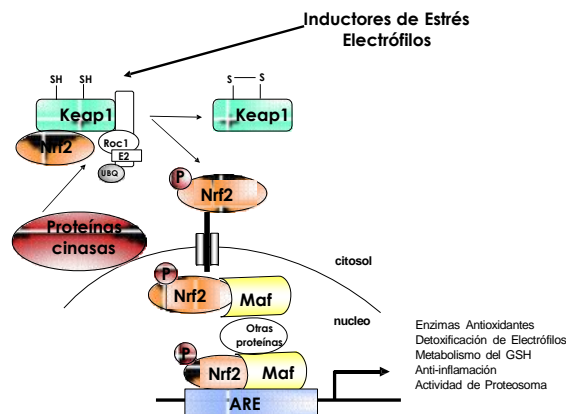


Figura 1. Efectos transcripcionales de Nrf2. Cuando Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo forma heterodímeros con las pequeñas proteínas Maf (Maf), lo cual facilita su interacción con las regiones ARE del ADN y la consecuente transcripción de genes antioxidantes y enzimas de fase II.

1.10 Inductores de Nrf2: Terbutil hidroquinona (tBHQ)

Los polifenoles se producen en plantas comestibles y forman parte de la dieta substancial de los humanos. La ingesta total de estos compuestos podría ser superior a los 1000 mg/día, lo que resulta ser una mayor cantidad que la ingesta de otros compuestos como los fitoquímicos o las vitaminas antioxidantes (Kuhnau, 1976). Es comúnmente aceptado que las dietas ricas en polifenoles tienen beneficios para la salud, pero la absorción de los polifenoles en los humanos es limitada y el mecanismo de acción de estas moléculas en el cuerpo aún no se comprende totalmente (Manach et al., 2005; Tang y Halliwell, 2010). Algunos de los reportes sobre los efectos biológicos de los polifenoles incluyen la actividad antioxidante (Bors y Saran, 1987; Kanner et al., 1987), la disminución de las enfermedades cardiovasculares (Manach et al., 2005), la prevención de diferentes enfermedades degenerativas relacionadas a la edad (Stevenson y Hurst, 2007), y la prevención de diferentes tipos de cáncer (Roginsky, 2005).

Los polifenoles son una familia muy grande y diversa de compuestos sintetizados por las plantas como parte de su metabolismo secundario. El anillo benzoico, el cual contiene tres dobles enlaces, facilita su reacción con un grupo hidroxilo, lo que le proporciona una capacidad antioxidante (Kanner et al., 1994; Lapidot et al., 2005). La FDA ha aprobado el consumo de antioxidantes sintéticos como los polifenoles, entre los que se encuentran los galatos, el BHT2 (Butil-hidroxitolueno), o el tBHQ (terbutil hidroquinona)-un metabolito del butil hidroxianisol-. Se ha probado en sistemas de cultivo de células y tejidos, que los compuestos fenólicos provenientes de plantas actúan como antioxidantes y poseen propiedades protectoras (Ramassamy, 2006), pero en algunas circunstancias, los polifenoles pueden también actuar como pro-oxidantes y citotóxicos (Tang y Halliwell, 2010; Lapidot et al., 2002a y 2002b). Aunque los polifenoles son agentes reductores fuertes, en condiciones *in vitro*, y en la presencia de oxígeno y iones metálicos, estos pueden actuar como pro-oxidantes de manera muy semejante al ácido ascórbico (Kanner et al., 1977). Se ha reportado que los polifenoles pueden auto-oxidarse y el oxígeno consumido puede producir radical superóxido, peróxido de hidrógeno, semiquinonas y quinonas (Lapidot et al., 2002a; Canada et al., 1990; Long et

al., 2000). Por otra parte, se ha demostrado la capacidad de extractos de manzana para inhibir la proliferación de células tumorales *in vitro*, y esta propiedad fue atribuida a los antioxidantes fenólicos (Eberhardt et al., 2000).

Una gran variedad de fitoquímicos han mostrado efectos quimiopreventivos debido a su capacidad de protección, o a través de la activación de procesos enzimáticos antioxidantes mediados por la vía de señalización del Nrf2. En particular el tBHQ (Lee et al., 2001; Ben-Dor et al., 2005), el resveratrol (Hsieh et al., 2006) y la curcumina (Dickinson et al., 2003) son conocidos por inducir una respuesta antioxidante y de expresión de enzimas de detoxificación mediados por la vía de señalización Nrf2/ARE, por lo que diferentes estudios han propuesto al tBHQ como un control positivo de la activación de la señalización de Nrf2 en células (Lee et al., 2001; Ben-Dor et al., 2005). Así, se ha reportado que el tBHQ induce la síntesis de NQO1 y GST en el hígado y la mucosa intestinal de ratones (Prochaska et al., 1985). Recientemente, además se demostró que la activación de Nrf2 mediada por tBHQ, previene la formación de depósitos del péptido β -amiloide después de la inducción de un estrés oxidante en cultivo de neuronas NT2N-un conocido modelo de línea celular para la enfermedad de Alzheimer (Eftekharzadeh et al., 2010)-, además de proteger contra el daño inducido por la isquemia cerebral inducida en un modelo *in vivo* (Shih et al., 2005).

1.11 Astrocitos

Los astrocitos representan la población de células gliales más abundante del cerebro, constituyendo más del 50 % del total celular de la corteza cerebral. Los astrocitos tienen papeles activos en la fisiología cerebral, respondiendo a los neurotransmisores y modulando la excitabilidad neuronal y la función sináptica. Estas células contienen mayores concentraciones de GSH y de enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión que las neuronas. Además, las células gliales son capaces de producir SOD y secretarla al espacio extracelular. Cuando las neuronas son cultivadas en presencia de astrocitos, se vuelven más resistentes a las lesiones inducidas por NO, O₂⁻ y H₂O₂ que cuando están solas. Existen evidencias que sugieren que los efectos neuroprotectores de los astrocitos son mediados por la transferencia del GSH o

sus precursores a las neuronas (Kahlert y Reiser, 2004; Takuma et al., 2004; Chen y Swanson, 2003).

Ante cualquier deterioro del tejido nervioso-ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad y envejecimiento-, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas pro-inflamatorias, lo que se denomina como "gliosis reactiva" o "glía activada". Se trata de una respuesta inflamatoria multifactorial que proporciona mecanismos de defensa frente a una diversidad de agresiones y que va dirigida a eliminar los agentes nocivos y a inhibir sus efectos perjudiciales. Al activarse, los astrocitos son capaces de migrar a los sitios de la lesión, donde proliferan y expresan moléculas co-estimuladoras que les permiten actuar como células presentadoras de antígeno y además pueden adquirir un fenotipo fagocítico. Así, estas células astrogiales activadas producen una gran variedad de factores neurotóxicos y pro-inflamatorios que incluyen a las citocinas, metabolitos de los ácidos grasos y formación de ROS, que a su vez son capaces de amplificar la respuesta inflamatoria (Hanisch, 2002; Van Rossum y Hanisch, 2004; Ladeby et al., 2005; Kim y Vellis, 2005). En forma resumida, se puede decir que la glía astrocitaria desempeña funciones de apoyo estructural, metabólico, trófico y de protección para las neuronas.

2. ANTECEDENTES

A lo largo de la evolución, los organismos vivos han tenido que adaptarse a condiciones y agentes adversos para lograr sobrevivir, por lo que han desarrollado diversos y complejos mecanismos para lidiar con ellos. Por muchos años, varias ramas dentro de las ciencias biológicas y de la salud, han identificado una serie de procesos conservados, durante los cuales una dosis baja o subletal de un agente o estímulo estresante es capaz de activar una respuesta adaptativa que incrementa la resistencia de una célula u organismo frente a un estrés mucho más severo y muchas veces letal. Al proceso en el cual los organismos tratan de mantener la homeostasis y adaptarse a un agente tóxico o dañino, se le conoce como —hormesisll (Calabrese et al., 2007). La hormesis puede definirse como el proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico, o bien un factor ambiental que es dañino a dosis altas, inducen una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo (Calabrese et al., 2007; Calabrese, 2008; Mattson, 2008; Hoffman, 2009; Rattan et al., 2009).

Los agentes horméticos más importantes que se han identificado a la fecha son la radiación, el calor, los metales pesados, los antibióticos, el etanol, los agentes pro-oxidantes, el ejercicio y la restricción alimentaria (Calabrese y Baldwin, 2003; Rattan, 2008). La respuesta hormética involucra la expresión de una gran cantidad de genes que codifican para proteínas citoprotectoras como las chaperonas del tipo de las que responden a estrés térmico (heat-shock proteinso HSP), enzimas antioxidantes, factores de crecimiento, metalotioneínas, etc. (Mathers et al., 2004; Sen et al., 2009; Calabrese et al., 2011).

Los compuestos más estudiados en la respuesta hormética son los fitoquímicos, además de una gran cantidad de moléculas capaces de inducir una respuesta celular adaptativa o pre-condicionante para contrarrestar el estrés oxidante, entre los que destacan los licopenos, la curcumina, el resveratrol, la tert-butil hidroquinona (tBHQ), el dialil trisulfuro, y el sulfurofano (Dillin y Cohen, 2011; Mathers et al., 2004; DiSilvestro et al., 2012), ya que estos se encuentran en bajas concentraciones en diferentes productos de

consumo humano, y por ello son candidatos interesantes (Radak et al., 2011; Calabrese et al., 2010). Diversos trabajos han demostrado que estos compuestos inducen la respuesta celular antioxidante mediante la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE, en particular aumentando la expresión de proteínas como la GST, la NQO1, la OH-1, la GST y la γ -GCS (Erlank et al., 2011). El uso de estos fitoquímicos en diferentes modelos resulta ser alentador para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el tBHQ ha sido utilizado para contrarrestar los daños inducidos en modelos de excitotoxicidad, isquemia, reperfusión, y en un cocultivo de neuronas, mientras que astrocitos de la zona nigroestriatal tratados con tBHQ son protegidos del daño neurotóxico inducido por la 6-hidroxidopamina (Kraft et al., 2004; Jakel et al., 2007; Imhoff y Hansen, 2010). Otro ejemplo del uso de fitoquímicos en la respuesta hormética es el uso de la curcumina, la cual se ha reportado que induce la expresión de la GST, la NQO1 y la OH-1 para contrarrestar el daño inducido por altas concentraciones de glucosa; además, se ha reportado que el tratamiento con curcumina disminuye la formación de la placa amiloide en ratones envejecidos de la cepa Tg2576, un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Pérez de la Cruz et al., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que el ácido ferúlico protege al sistema de membranas sinaptosomales del daño inducido con los radicales hidroxilo y peroxilo mediante el incremento en la expresión de la γ -GCS, NQO1 y OH-1. Además, se ha observado que el tratamiento con el ácido ferúlico disminuye la activación de la microglia en ratones expuestos al A β (Mohammad y Butterfield, 2005).

Adicionalmente, hay evidencias de que la inducción de las respuestas horméticas en los tratamientos contra las enfermedades neurodegenerativas involucran cambios en el estado redox celular; estas modificaciones a su vez, reclutan vías de señalización celular que regulan procesos de proliferación, supervivencia y reparación. Las vías de señalización más importantes son aquellas que contienen elementos susceptibles de ser activados por la modificación del estado redox celular. Entre ellas destaca la de PI3K/Akt/NF- κ B/Bcl-2 en el proceso de supervivencia celular (Luna López et al., 2010 y 2013), HSF1/HSP en la regulación de proteínas mal plegadas, Nrf2/ARE (NQO1, GST, OH-1, γ -GCS) en la respuesta antioxidante, y JNK/p38/PKC y/o PI3K en la activación de Nrf2. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se

han llevado a cabo en animales neonatos o jóvenes y en cultivos celulares, por lo que no se sabe si este tipo de respuesta hormética aún sea posible de inducir en los animales viejos, particularmente la activación de la vía de protección antioxidante Nrf2/ARE.

Es por ello que en este trabajo se analizará la susceptibilidad diferencial de cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas de diferentes edades frente a diversos agentes tóxicos cuyo mecanismo de acción se ha relacionado con la participación del estrés oxidante, para posteriormente evaluar si los astrocitos de ratas viejas pre-tratados con tBHQ logran activar una respuesta hormética, aumentando la actividad de enzimas antioxidantes y del GSH, para así protegerse con el daño inducido por el tóxico.

3. JUSTIFICACIÓN

La población mexicana atraviesa por una fase de plena y acelerada transición demográfica. Este proceso se inició en la década de los treinta con el descenso paulatino de la mortalidad, y posteriormente se acentuó, a mediados de los sesenta, con la disminución de la fecundidad. En la actualidad, el número de niños y adolescentes es significativamente mayor al de los —*adultos mayores*ll (≥ 65 años); uno de cada tres mexicanos tiene menos de 15 años, en tanto que sólo uno de cada veinte tiene más de 65. Sin embargo, en el año 2050, esta composición se verá profundamente alterada: se calcula que uno de cada siete mexicanos estará en edad escolar, mientras que los adultos mayores representarán a uno de cada cuatro habitantes del país (Tuirán, 2002). Sin embargo, aunado a los beneficios que puede traer la longevidad, se encuentran ciertas desventajas, como la aparición de una gran cantidad de enfermedades asociadas a la tercera edad, entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas. Es por ello que resulta importante el tratar de entender cómo se lleva a cabo el proceso del envejecimiento para tratar de aplicar las medidas sanitarias necesarias, y así disminuir el riesgo de adquirir dichas enfermedades; además, para atenuar el deterioro adquirido durante el transcurso de la vida de un individuo.

Las enfermedades neurodegenerativas más comunes asociadas a la edad avanzada son la EA, la EP y la enfermedad de Huntington (EH). En el caso de la EA, se ha propuesto que la inflamación y el estrés oxidante asociados al envejecimiento son factores clave en el desarrollo de esta patología, a través de la disfunción glial (Von Bernhardi et al., 2007). Por otra parte, la EP es una de las que más frecuentemente se asocian al envejecimiento. Esta patología no es adquirida de manera convencional por factores genéticos, sino que su aparición ha sido relacionada con factores ambientales, como plaguicidas y metales pesados, en donde se encuentran involucrados los radicales libres (Nakaso et al., 2007). Finalmente, la EH es una enfermedad autosómica dominante en la cual se han involucrado componentes oxidantes y nitrosantes que participan en la degeneración neuronal. La enfermedad comienza sus manifestaciones en la edad media adulta del individuo (35-40 años) y su

progresión puede durar de 15 a 20 años (Phillips et al., 2005; Martin et al., 1986).

La relación que existe entre las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento se ha estudiado en modelos de animales, principalmente en los roedores. Otro modelo muy interesante pero poco estudiado es el de los cultivos primarios de astrocitos; se ha comprobado que los astrocitos desempeñan un papel importante en muchos de los aspectos de la función del sistema nervioso, de modo que es muy importante entender la manera en la que participan los astrocitos durante las diferentes enfermedades neurodegenerativas.

En los últimos años se han desarrollado diferentes modelos de daño oxidante que se han correlacionado con las enfermedades neurológicas relacionadas al envejecimiento. En nuestro grupo de trabajo hemos establecido un modelo de cultivo de astrocitos primarios provenientes de organismos de diferentes edades, mismo que nos ha ayudado a entender cómo se lleva a cabo la respuesta al estrés oxidante en relación a la edad de los organismos. Lo que sin duda alguna es un hallazgo en el montaje de modelos celulares que servirán para establecer las condiciones metodológicas para desarrollar modelos de co-cultivos celulares y modelos animales. Nuestro grupo de trabajo también ha establecido modelos celulares de respuesta hormética antioxidante, por lo que el entender si los organismos de edades avanzadas logran activar una respuesta hormética antioxidante ayudará a desarrollar estrategias enfocadas al mejoramiento de la calidad de vida de los individuos afectados por alguna enfermedad neurodegenerativa, así como para la prevención de las mismas, y lograr así una mejor calidad de vida en la población mexicana.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Con base en lo mencionado hasta aquí nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Serán los astrocitos provenientes de animales adultos y seniles capaces de activar la respuesta antioxidante vía Nrf2 cuando son pre-tratados con un inductor de la respuesta antioxidante de la misma manera como lo hacen los astrocitos de neonatos y de esta manera reducir los efectos de agentes tóxicos?

5. HIPÓTESIS

Puesto que los astrocitos participan activamente en la respuesta antioxidante en el SNC, y dado que la capacidad antioxidante disminuye con la edad, los astrocitos de animales viejos generarán una menor respuesta hormética antioxidante vía Nrf2 después del pre-tratamiento con tBHQ, y manifestarán una susceptibilidad mayor frente al estrés oxidante generado por el agente neurotóxico MPP+.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la susceptibilidad de los cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas de diferentes edades frente al MPP+ y determinar si son capaces de activar una respuesta hormética antioxidante vía Nrf2 después del pre-tratamiento con tBHQ que los proteja del daño inducido por el tóxico.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del péptido β -amiloide y del MPP+ en cultivos primarios de astrocitos primarios provenientes de individuos de diferentes edades (neonatos, adultos y seniles) para determinar el agente tóxico a emplear como generador de daño oxidante en modelos posteriores.
2. Determinar la viabilidad y funcionalidad celular en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de corteza de ratas de diferentes edades, ante diferentes concentraciones y tiempos de exposición al MPP+.
3. Determinar el daño oxidante producido por las diferentes concentraciones de MPP+ en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de corteza cerebral de ratas de diferentes edades y diferentes tiempos.
3. Determinar la participación de Nrf2 en la respuesta antioxidante inducida con tBHQ en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de corteza cerebral provenientes de ratas de diferentes edades.
4. Determinar la participación de Nrf2 en la respuesta antioxidante inducida con tBHQ en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de corteza cerebral provenientes de ratas de diferentes edades ante el daño oxidante inducido con MPP+

8. MATERIALES Y MÉTODO

8.1 Animales

Para realizar todos los experimentos que se presentan en esta tesis se utilizaron 40 ratas neonatas de 3 días de nacidas, 80 ratas adultas de 9 meses de edad y 80 ratas seniles de 24 meses de edad, todas de la cepa Wistar. Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura ambiente, con un ciclo de luz normal y con libre acceso de comida y agua) y se manejaron de acuerdo a los criterios establecidos por la —Guía para el Cuidado de los Animales del Laboratorio (Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina) y a la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

8.2 Aislamiento y caracterización de astrocitos

El cultivo primario de astrocitos se obtuvo de la corteza cerebral de los animales. Para ello, se sacrificaron las ratas por decapitación, se removió la piel y se extrajo el cerebro por la parte dorsal. El cerebro se colocó en 1 mL de solución 1 que contenía 5 mL de solución de Krebs, 45 mL de agua destilada, 0.3 % de albúmina sérica bovina, y 400 μ L de $MgSO_4$ al 3.8 %. Se realizó una disección fina del cerebro dejando solo la corteza cerebral en donde se removieron los vasos de la corteza. El tejido se disgregó finamente con un bisturí, se transfirió a 10 mL de la misma solución 1 y se centrifugó a 1,000 x g por un min a temperatura ambiente (TA). Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 6 mL de la solución 2 que contenía 6.25 mL de la solución 0.026% de tripsina SIGMA T-4665 sobre el tejido, y se incubó a 37° C durante 8 min. Se adicionaron 6 mL de solución 4 para detener la reacción, la cual contenía 5 mL de solución 1, 1 mL de solución 3 y 10 % de suero fetal bovino. Se centrifugó a 1,000 x g por un min a TA y se retiró el sobrenadante. A continuación, se filtraron 2 mL de solución 3 que contenía 4.7 mL de la solución 1, 0.008% de

DNAasa SIGMA D- S025, 40 μL de MgSO_4 al 3.8 %, y 20 % de suero fetal bovino. Se disoció el tejido hasta que se obtuvo una suspensión homogénea que se filtró en una jeringa con malla. Se recuperó el filtrado y se depositó en la solución 5 que contenía 5 mL de la solución 1, 30 μL de MgSO_4 al 3.8 %, 6 μL de CaCl_2 al 1.2 %, y se centrifugó a 1,000 x g durante 6 min a 25°C. Se retiró el sobrenadante y se disolvió el pellet en medio de cultivo. Se contaron las células y se sembraron en pozos de 1 cm. Al quinto día de sembrados, se les cambió el medio. Se cultivaron en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (BSA) al 0.11 %, glutamina, 0.15% de glucosa y 0.1 % de penicilina estreptomicina, para luego incubarse a 37° C y 5 % de CO_2 .

Posteriormente se caracterizaron los cultivos celulares de astrocitos; para ello, se determinó la presencia de un marcador específico como lo es la proteína ácida fibrilar de la Glia (GFAP), mediante inmunocitoquímica. Se sembraron 1×10^4 células en un cubreobjetos; 24h después se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS; posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min. Inmediatamente después se lavaron con PBS dos veces, y se incubaron con solución de bloqueo (2% de BSA, 0.2% de leche descremada, 0.4% de Tritón X 100 en PBS) durante 1 h; una vez transcurrido el tiempo se incubaron durante otra hora con el anticuerpo primario anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:50 en PBS-Tween al 0.1%. Posteriormente, se lavaron las células con PBS-Tween al 0.1% durante 5 min en agitación por 3 veces, y después se les incubó durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario marcado con el fluorógeno ALEXA 594 con una dilución 1:200 en PBS-Tween al 0.1% protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó 4 veces con PBS Tween 0.1%, y posteriormente se incubó con HOECHST (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 min, se lavó con PBS 3 veces y posteriormente se adicionó solución de montaje fluorescente (Dako Cytomation, Glostrup Denmark). Se obtuvieron las imágenes con una microscopio confocal OLIMPUS BX-51W1 con un aumento de 30X usando una lámpara de mercurio, y dos filtros: U-MWU2 330-385nm para la excitación y 420nm para emisión para el HOECHST, y U-MRFPHQ535-555 nm para la excitación y 570-625 nm de emisión para el fluorógeno ALEXA 594.

8.3 Tratamientos con los agentes tóxicos

Para determinar si existía una diferencia en cuanto a la sensibilidad por distintos tóxicos que generan estrés oxidante, se emplearon los agentes tóxicos β -amiloide (fragmento 25-35) y MPP+, y se usó al H_2O_2 como control positivo de daño oxidante, para lo cual previamente se realizó una curva dosis respuesta (100,200 y 400 μ M) por 1 h en astrocitos provenientes de neonatos. Los experimentos de la primera parte de la tesis, donde se evaluaron los tóxicos, se realizaron con dos grupos de estudio: neonatos y adultos. Sin embargo, una vez determinado que el tóxico a emplear sería el MPP+, así como su concentración y tiempo, los experimentos se realizaron en los tres grupos de animales: neonatos, adultos y seniles.

Para las determinaciones se sembraron 3×10^5 células en placas multipozos de 1 cm de diámetro, 24 h después se adicionaron 50mM del tóxico β -amiloide (Croce et al., 2011; Ren et al., 2011) o 50 μ M de MPP+ (Hazell et al., 1997) durante 5 o 72 horas. De aquí en adelante, a estos tratamientos se les llamará tiempos de exposición cortos o largos, respectivamente. Las concentraciones empleadas en esta parte del estudio se basaron en los reportes de la literatura.

8.4 viabilidad celular

Posteriormente a los tratamientos antes mencionados, las células se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina-verseno al 0.1 %. Se tomó una alícuota de 20 μ L de suspensión y se re-suspendieron en un volumen igual de solución fisiológica de azul tripano al 0.4%, se contaron las células vivas utilizando un hemocitómetro y un microscopio de contraste de fase; los resultados presentados por cada determinación representan el promedio del conteo de 4 campos en el microscopio

8.5 determinación de la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT)

La actividad mitocondrial se evaluó indirectamente mediante la técnica de Mosmann (1983), cuyo fundamento se basa en la reducción del compuesto MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2, 5, difenil bromuro de tetrazolio) por medio de la transferencia de electrones a través del complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Para realizar el ensayo se sembraron 3×10^5 astrocitos en pozos de 1cm, se aplicaron los tratamientos para cada uno de los experimentos como se describió anteriormente, se les retiró el medio y se lavaron con PBS. Se adicionaron 100 μ L de MTT (0.5 mg/mL) a pH 7.5. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C. Se retiró el MTT y se agregaron 80 μ L de solución de extracción (HCl 0.04 M en isopropanol) a cada pozo. Las placas de cultivo se colocaron sobre un plato de agitación (Thermolyne AROS 160) durante 15 min a TA para disolver el formazan. El contenido de cada pozo se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en un lector multimodal de placas (Beckman DSX-880). El valor del fondo se cuantificó a 630 nm, y se restó a la determinación anterior. La funcionalidad mitocondrial se determinó como densidad óptica (D.O.) por número de células, y los resultados se presentaron normalizados.

8.6 Lipoperoxidación (TBARS)

Se evaluó el daño oxidante a lípidos determinando los compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), los cuales principalmente son productos de la lipoperoxidación. Para ello se sembraron 5×10^5 de células, se aplicó cada tratamiento, se lavaron con PBS y se despegaron las células con un gendarme; posteriormente, se adicionaron 500 μ L del reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético y 2.54 mL de ácido clorhídrico), y se incubó la muestra durante 20 min a 94°C. Posteriormente, se incubaron sobre hielo durante 5 min y se centrifugaron a 3,000 x g durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó en un espectrofotómetro el producto de la

reacción con TBA a 532 nm. El precipitado se lavó con PBS hasta eliminar la acidez, y se cuantificó la concentración de proteínas por medio de la técnica de Bradford. Los resultados se expresaron en nmol de TBARS/mg de proteína. Las concentraciones fueron calculadas con una curva de malondialdehído (MDA), la cual llevó el mismo procesamiento que la muestra.

8.7 Determinación de proteínas oxidadas

Para evaluar el daño oxidante a proteínas, se sembraron 5×10^5 células y se les aplicaron los mismos tratamientos; posteriormente, se lavaron las células con PBS y se despegaron con gendarme. Se recuperaron las células y se re-suspendieron en 200 μ L del buffer de lisis M-per, el cual estaba suplementado con un inhibidor de proteasas (Complete, ROCHE), 0.1mM de DTT y 0.1mM de PMSF. Se incubaron por 15 min en hielo, y posteriormente se centrifugaron a 14,000 x g durante 5 min; se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas por medio de la técnica de Bradford. Usando 50 μ g de proteína, se determinaron los niveles de proteína oxidada con el kit oxy-blot, siguiendo las especificaciones del proveedor.

8.8 Análisis de proteínas por Western blot

La presencia de las proteínas GFAP, Nrf2, GST y γ GCS (Neomarker, Fremont CA, USA) en los cultivos primarios de astrocitos fue determinada por medio de la técnica de Western blot. Las células se despegaron con gendarme y se re-suspendieron en el amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO_3 , 1 μ g/mL aprotinina, 1 mM PMSF, y 1 μ g/mL leupeptina (complete de Roche)). Los homogenados celulares se incubaron a 4 °C durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 20 min. La concentración de proteínas fue determinada en el sobrenadante utilizando el reactivo comercial de Bradford (BioRad, Hercules CA, USA) (Bradford, 1976). Las proteínas en los lisados celulares se separaron en un gel SDS-PAGE al 12 % y posteriormente se

transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules CA, USA). Las membranas se bloquearon con TBS-Tween 0.1 %, 5 % de leche libre de grasa durante 1 h, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal respectivo durante 2 h. Del anticuerpo primario se utilizó una dilución 1:500. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabano (Pierce, Rockford IL, USA) durante 1 h, con una dilución de 1:5000. Después, se lavó la membrana tres veces, los blots se revelaron utilizando un reactivo quimioluminiscente comercial (Supersignal[®] Pierce, Rockford IL, USA) en un fotodocumentador Kodak 1200.

8.9 Inmunolocalización de Nrf2

Después de que se realizaron los Western blots para establecer las concentraciones en las cuales se incrementaban los niveles de expresión de Nrf2 con el tratamiento con tBHQ en cada uno de los grupos de estudio, se realizó un experimento a diferentes tiempos de exposición (0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 24 h) exponiendo a los astrocitos a las concentraciones seleccionadas. Posteriormente, se lavaron los cultivos con PBS y después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min; inmediatamente después se incubaron con solución de bloqueo (2% de BSA, 0.2 de leche descremada y 0.4% de Triton X100 en PBS) durante 1 h a TA. Después, se incubaron con el anticuerpo primario anti-Nrf2 (SC-722, Santa Cruz Biotechnology) con una dilución 1:50 y se lavaron 3 veces con PBS-TWEEN al 0.1% para posteriormente incubarlos con el anticuerpo secundario (ALEXA 488 dilución 1:200 en PBS) durante 1 h. Posteriormente, se lavaron 4 veces con PBS-TWEEN 0.1% y se tiñeron los núcleos con DAPI (10µg/mL) durante 10 min. Las células se lavaron 2 veces más con PBS y se montaron con medio fluorescente de montaje (Dako Cytomation, Glostrup Denmark). Se adquirieron imágenes en un solo plano y se sobrepusieron para determinar la localización de Nrf2 en un microscopio confocal LSM-META-Zeiss Axioplan 2 con un aumento de 30X; se utilizó el Diodo Laser 405nm para el cromóforo DAPI y el Ar/ML 458/488/514nm

para el ALEXA 488. El análisis de co-localización se realizó utilizando el programa ZEN 2010 versión 6.0 de Carl Zeiss.

8.10 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Para determinar si el factor de transcripción Nrf2 que estaba en el núcleo se encontraba activo (unido a su secuencia consenso en el DNA), se determinó su activación mediante la técnica de EMSA. Se aislaron los extractos nucleares utilizando Igepal CA-630, de acuerdo a la técnica de Gómez-Quiroz y colaboradores (2008). La concentración de proteína fue determinada mediante el reactivo comercial de Bradford (BioRad, Hercules CA, USA)(Bradford, 1976). La unión de Nrf2 a su secuencia consenso de DNA fue determinada utilizando la siguiente secuencia de oligonucleótidos: 5'TTTTCTGCTGACTCAAGGTCCG3' (Promega, Madison, WI) (Kweon et al., 2006). La sonda se marcó con la cinasa de polinucleótidos T4 (USB, Cleveland, OH) y el ATP se marcó radioactivamente en el fosfato gama con ^{32}P (3000Ci/mmol, MP Biomedical, Irving, CA). La mezcla de reacción contenía 20 μg de extracto de proteína nuclear en 5 μL de buffer de incubación (50mM de Tris-HCl, pH 7.5, 200mM de NaCl, 5mM EDTA, 5mM de β -mercaptoetanol, 20% de Glicerol, 1 μg de poli dl-dC, y la sonda marcada con ^{32}P). El experimento de competencia se preparó adicionando 100 veces más del oligonucleótido no marcado radioactivamente y fue incluido en la mezcla de reacción durante 5 min. Posteriormente, se corrieron las reacciones electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas. Los geles fueron expuestos en una pantalla sensible a las emisiones β del fósforo denominada Storage Phosphor Screen (Amersham Bioscience, Arlington IL, USA) y fueron analizadas 24 h después en un analizador de imágenes multimodal (Typhon 9400; Amersham Bioscience), utilizando el software Image Quant TL (Amersham Bioscience).

8.11 Determinación del estado redox mediante el cociente GSH/GSSG

8.11.1 Determinación del GSH

Para realizar el ensayo se sembraron 5×10^5 astrocitos, los cuales se despegaron con gendarme y se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 20 min. El botón se resuspendió en 3.75mL de fosfatos/EDTA, del cual se tomaron 500µL para proteína y al resto del homogenado se le agregó 1mL de H_3PO_3 , el cual se centrifugó a 4°C a 1500rpm por 10min; a continuación se tomaron 0.5mL de sobrenadante más 4.5mL de buffer de fosfatos-EDTA, del cual se tomaron 100µL de la dilución y se les agregaron 1.8mL de buffer de fosfatos-EDTA más 100µL de OPA. Estos se mezclaron y se incubaron a TA por 15min. Finalmente, se leyeron con su respectiva curva con 1µg/mL de buffer de solución stock de GSH en un fluorómetro a una emisión de 420nm y excitación de 350nm, con SLIT de 5.

8.11.2 Determinación de GSSG

Para determinar el GSSG, se realizó el mismo procedimiento que para el GSH, pero después de centrifugar, se tomaron 0.5mL de sobrenadante a los cuales se les agregaron 200µL de N-etilmaleimida (0.04M) y se dejaron incubar a TA por 30 min para permitir la interacción con el GSH. A continuación, se les agregaron 4.3 mL de NaOH (0.01N) más 100µL de la mezcla y 1.8mL de buffer de fosfatos/EDTA, además de 100µL de OPA, y se procedió a incubar por 15min a TA. Finalmente, se leyeron las muestras junto con su curva de 20µg/ml de buffer de solución stock de GSSH en un fluorómetro a una emisión de 420nm y excitación de 350nm, con SLIT de 5.

8.12 Análisis estadístico

Todos los datos representan al menos tres experimentos independientes por grupo experimental, realizados por triplicado. Los datos reportados son la media de los valores \pm D.S., y los resultados fueron analizados usando la prueba paramétrica de ANOVA de una sola vía, seguida de una prueba de Tukey-Kramer. Se consideraron múltiples intervalos de significancia ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$).

9. RESULTADOS.

9.1 Cultivos primarios de astrocitos

Se aislaron e identificaron astrocitos de la corteza cerebral de ratas de la cepa Wistar provenientes de individuos recién nacidos (3 días), adultos (9 meses) y seniles (24 meses). Los astrocitos fueron identificados utilizando técnicas inmunológicas, determinando la presencia de la Proteína Ácida Fibrilar de la Glia (GFAP), una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto, la cual se utiliza como un marcador característico de los astrocitos del Sistema Nervioso Central. En la Figura 1a se muestra una imagen representativa de microscopia confocal de los cultivos primarios de astrocitos, en la cual se observa la presencia de la proteína GFAP en rojo (anticuerpo secundario ALEXA 594), así como los núcleos celulares en azul (Hoechst). Se determinó el porcentaje de astrocitos en el cultivo cuantificando el número de células totales entre el número de células positivas a GFAP x 100. Los resultados mostraron que los cultivos obtenidos estaban conformados en más del 90% de astrocitos. Así mismo, se determinaron los niveles de expresión de la proteína GFAP en los cultivos de astrocitos provenientes de animales de diferentes edades y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 1b), confirmando que una vez estandarizado el aislamiento de los astrocitos, el número de estas células era equivalente en los tres grupos estudiados.

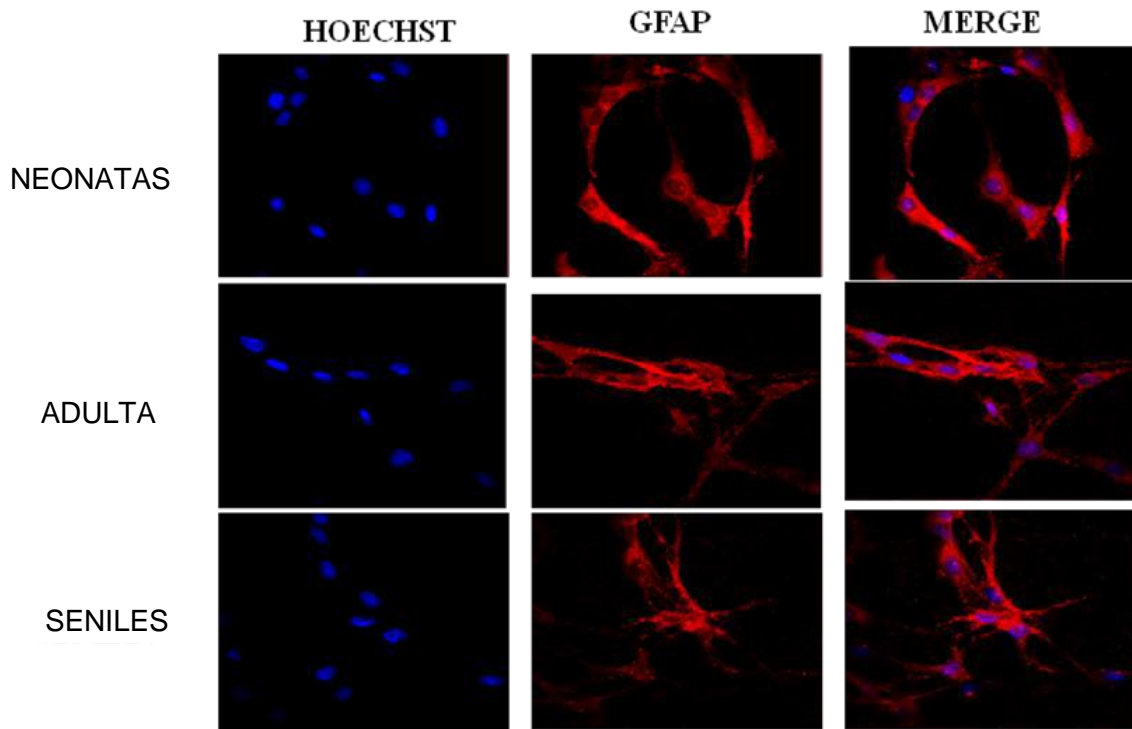


Figura 1a :Caracterización inmunocitoquímica de astrocitos provenientes de la corteza de cerebro de ratas de diferentes edades, neonatas (3 días), adultas (9 meses), seniles (24 meses). Los astrocitos fueron identificados por ser positivos a la proteína GFAP e identificados en color rojo (ALEXA 594), los núcleos fueron teñidos en azul (Hoechst). El porcentaje de células positivas se determinó contando el número total de células entre el número de células positivas a GFAP x 100.

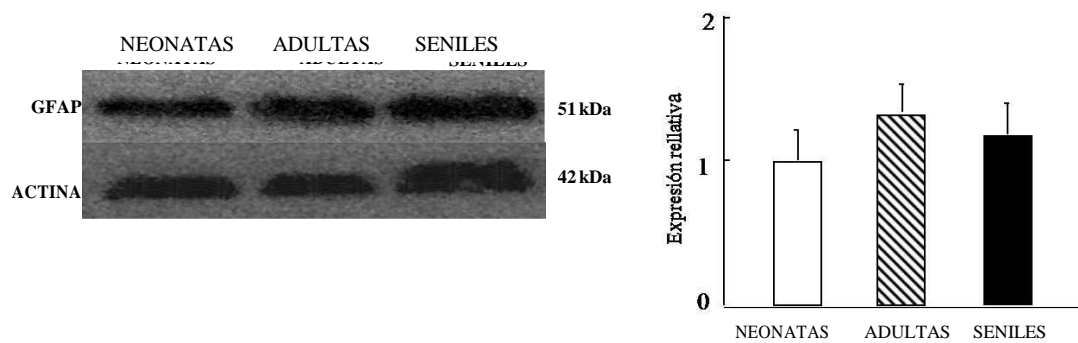


Figura 1b: Análisis de los niveles de expresión de la proteína GFAP de extractos de proteínas provenientes de cultivos primarios de astrocitos de diferentes edades, neonatas (3 días, barra abierta), adultas (9 meses, barra surrada) y seniles (24 meses, barra negra) fueron evaluados mediante la técnica de Western blot. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes D.S.; Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante una prueba de ANOVA, con una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con una significancia de $p=0.05$.

9.2 H₂O₂ como control positivo de daño oxidante

Puesto que los dos agentes neurotóxicos que se evaluaron en este trabajo, se basan en una parte importante de su mecanismo de acción en la generación de daño celular oxidante, se utilizó al H₂O₂ como control positivo. Para determinar la concentración adecuada de H₂O₂ necesaria para generar el daño oxidante, se realizó una curva dosis respuesta.

Los resultados de la Figura 2 muestran que la viabilidad y funcionalidad celular disminuyen de manera dosis dependiente a la concentración. Como se puede observar en la Figura 2, el tratamiento con una concentración de 100μM disminuye en un 50% la viabilidad y funcionalidad celular, mientras que las concentraciones de 200 y 400μM lo hacen en más del 75%, por lo que la dosis que se empleó para evaluar el daño oxidante fue la de 100μM.

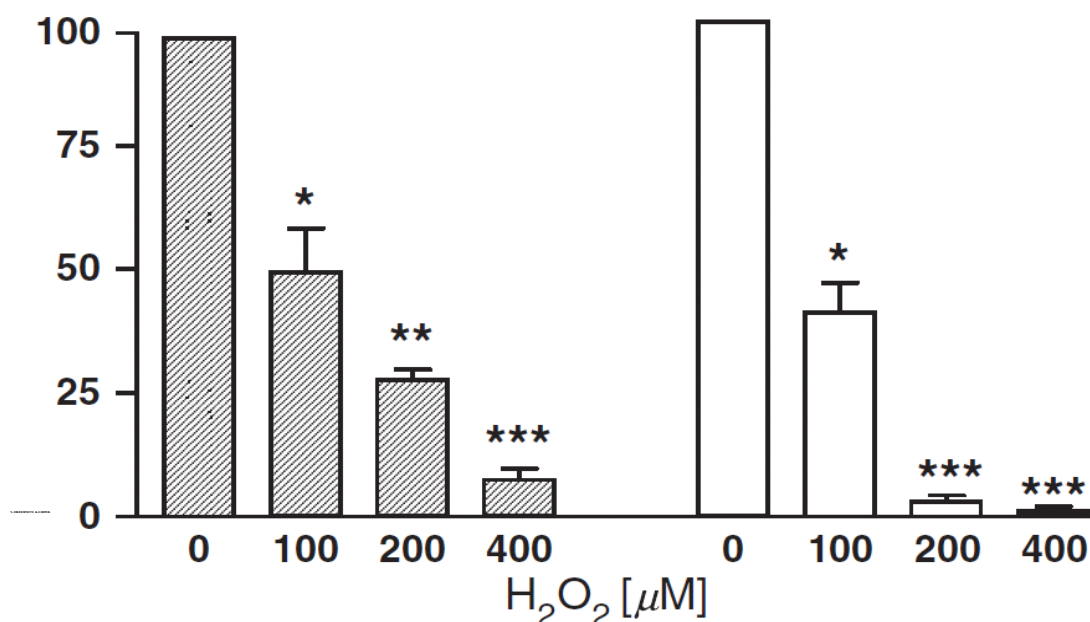
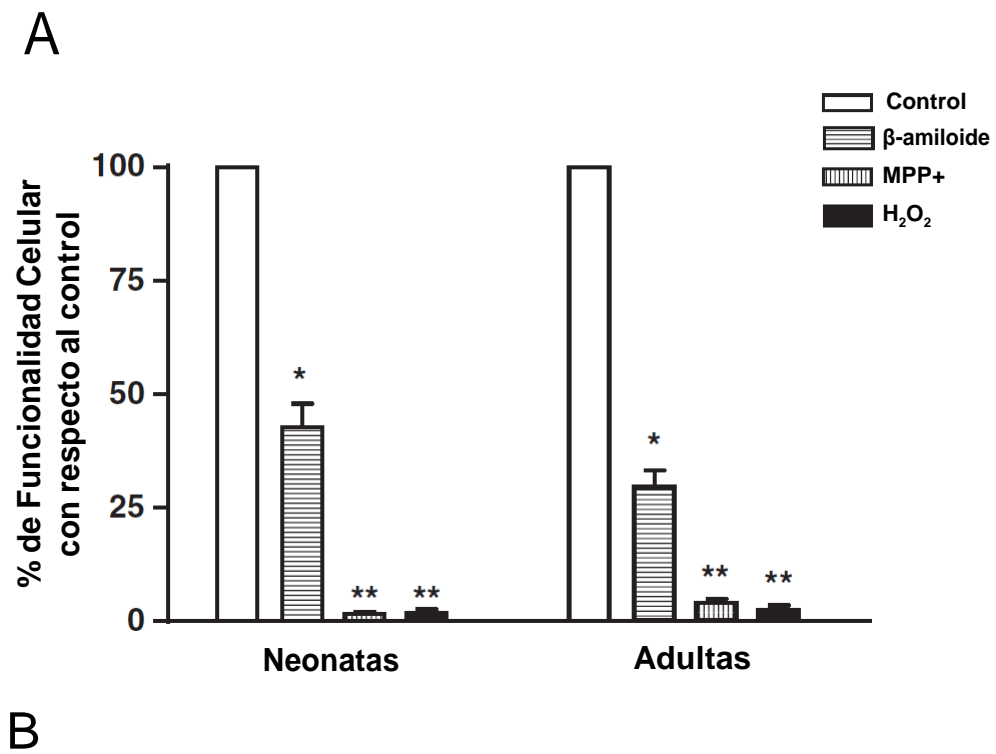
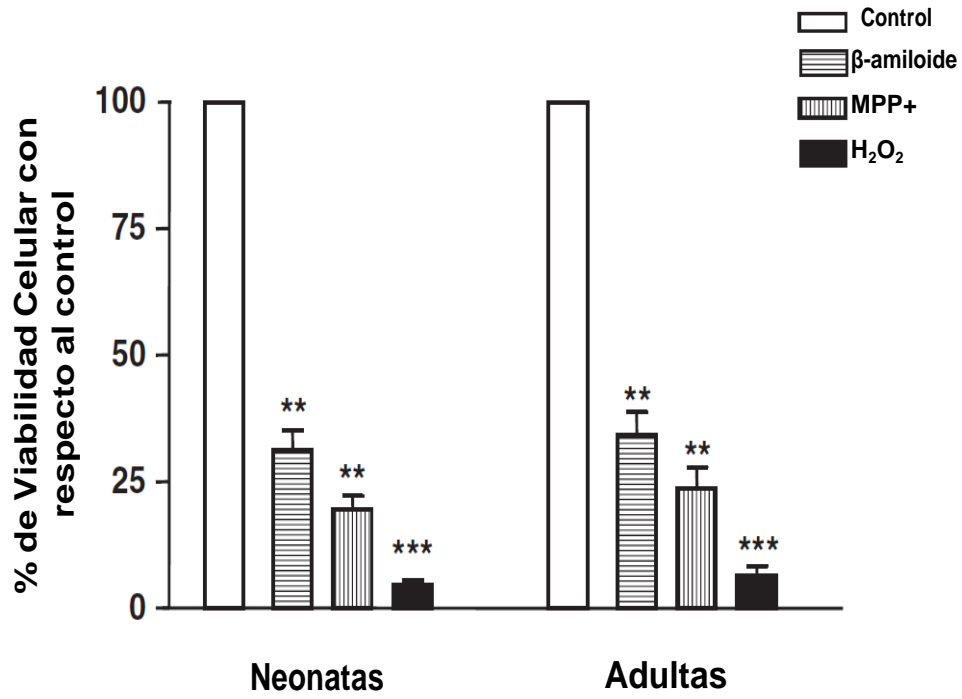


Figura 2: Viabilidad y funcionalidad celular de astrocitos provenientes de ratas neonatas tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ durante 1 hora de exposición. La viabilidad celular fue determinada mediante la técnica de exclusión de azul tripano (Barras azuradas). La funcionalidad celular fue determinada mediante la técnica de MTT (Barras abiertas). Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los valores representan la media D.S. Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se aplicó una prueba estadística de ANOVA y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples de Tukey -Kramer. (*) p?0.05, (**) p?0.01, (***) p?0.001

9.3 Efectos citotóxicos a tiempos largos de exposición al MPP+ y β -amiloide

Para determinar cuál agente neurotóxico presenta un mayor efecto diferencial entre los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas y adultas, se trató a los cultivos con dichos tóxicos por 72 h. Los resultados muestran que ambas toxinas son capaces de disminuir la viabilidad y funcionalidad celular de una manera significativa (Figuras 3A y 3B). La viabilidad celular disminuyó aproximadamente en un 60% en respuesta al tratamiento con el β -amiloide ($p \leq 0.01$), 80% en el tratamiento con MPP+ ($p \leq 0.01$) y 95% en el tratamiento con H_2O_2 ($p \leq 0.001$); todos con respecto al control (Figura 3A). La funcionalidad mitocondrial fue severamente afectada (Figura 3B) y disminuyó aproximadamente entre el 60 y 70% cuando los astrocitos fueron expuestos al β -amiloide ($p \leq 0.05$), o totalmente abatida en los tratamientos con MPP+ o H_2O_2 ($p \leq 0.01$). Sin embargo, aunque que los resultados muestran un efecto más evidente en la funcionalidad mitocondrial en comparación a la evaluación de la viabilidad celular, no se observaron diferencias entre los grupos de astrocitos de neonatos y adultos.

Al evaluar el daño oxidante inducido con las dos toxinas, se pudo observar que a tiempos largos (72h) ambas pueden inducir un incremento en la lipoperoxidación (Figura 3C), así como en la oxidación de proteínas (Figuras 4A y 4B), sin embargo, nuevamente no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de edad analizados, por lo que se decidió evaluar los efectos de los tóxicos a tiempos más cortos.



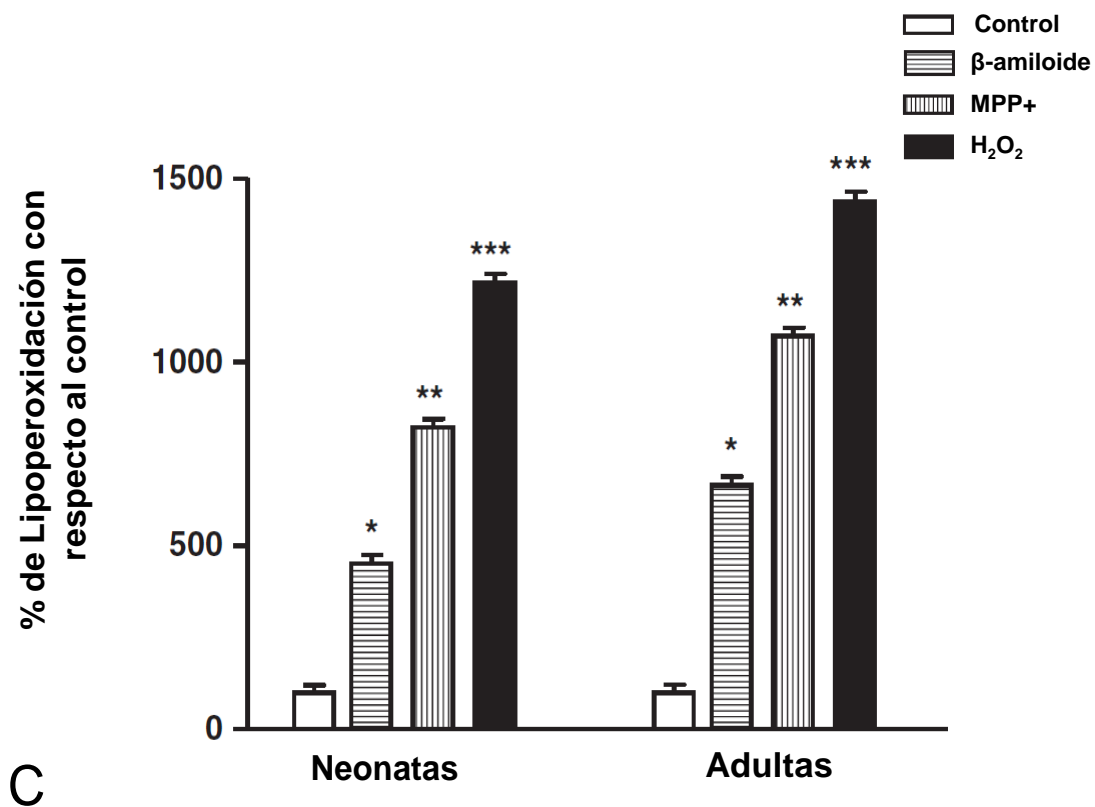


Figura 3. Efectos citotóxicos de la exposición prolongada al β -amiloide y a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) en cultivos de astrocitos de rata. Viabilidad Celular (A), Funcionalidad mitocondrial (B) y lípido peroxidación (C) Fueron determinadas en cultivos de astrocitos de ratas provenientes de animales, neonatos y adultos después de 72 horas de tratamiento con cada una de las toxinas, como fue descrito en materiales y métodos. Cada punto representa la media D.S de nueve determinaciones en tres experimentos independientes. Los valores de significancia con respecto al control fueron: *($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$).

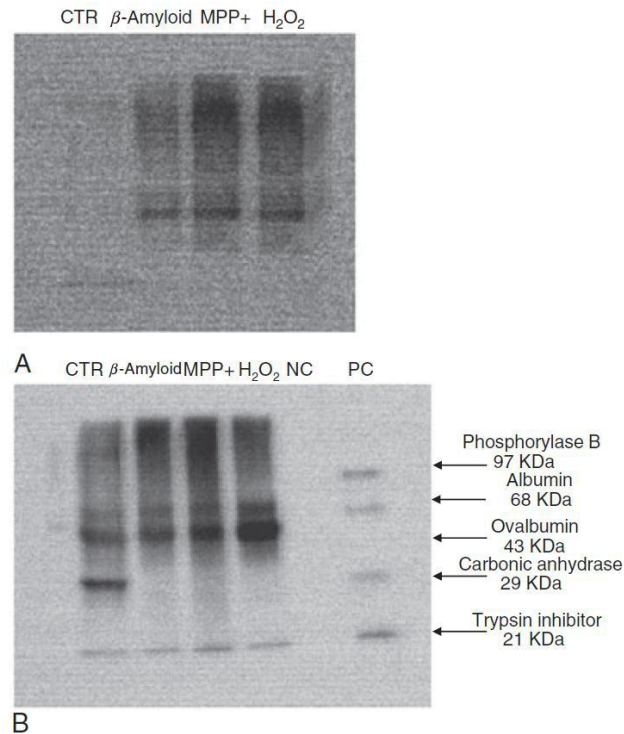


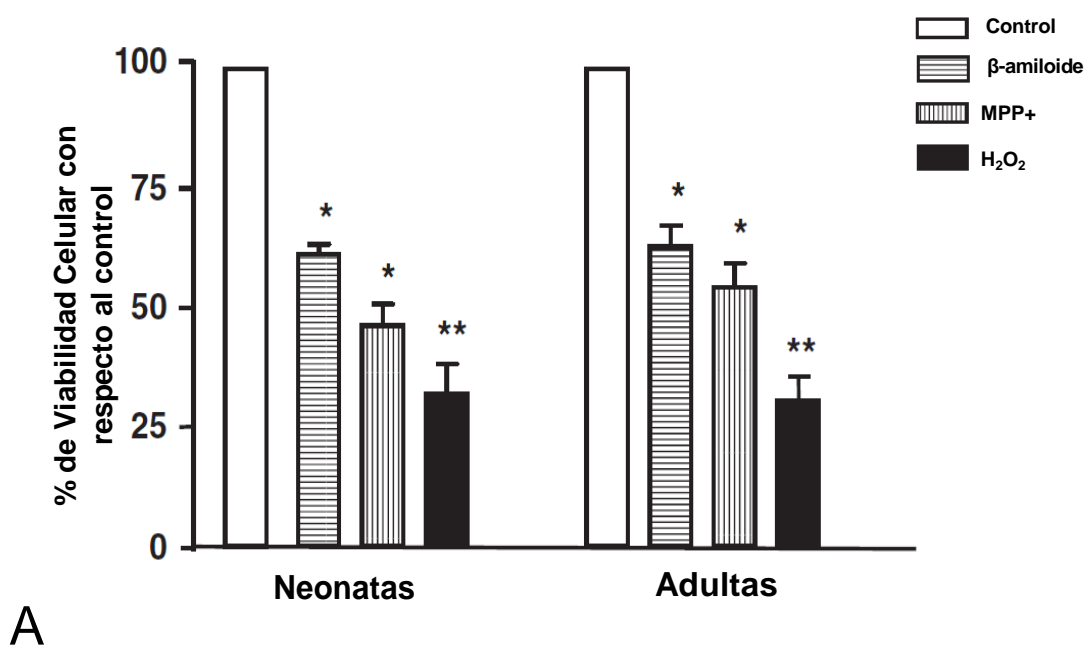
Figura 4: Determinación de los niveles de proteínas oxidadas después de la exposición por tiempo prolongado al β -amiloide y al 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) en cultivos de astrocitos de ratas. Oxiblots representativos obtenidos de cultivos primarios de astrocitos de ratas neonatas (A) y adultas (B) Después de 72 horas de exposición a las toxinas β -Amiloide ,MPP+ y H_2O_2 (como control positivo de toxicidad oxidante). El control negativo (NC) y el control positivo (PC) son estándares internos provistos en el kit comercial. Los oxiblots fueron realizados 2 veces en tres experimentos independientes, como se describió en Materiales y Métodos.

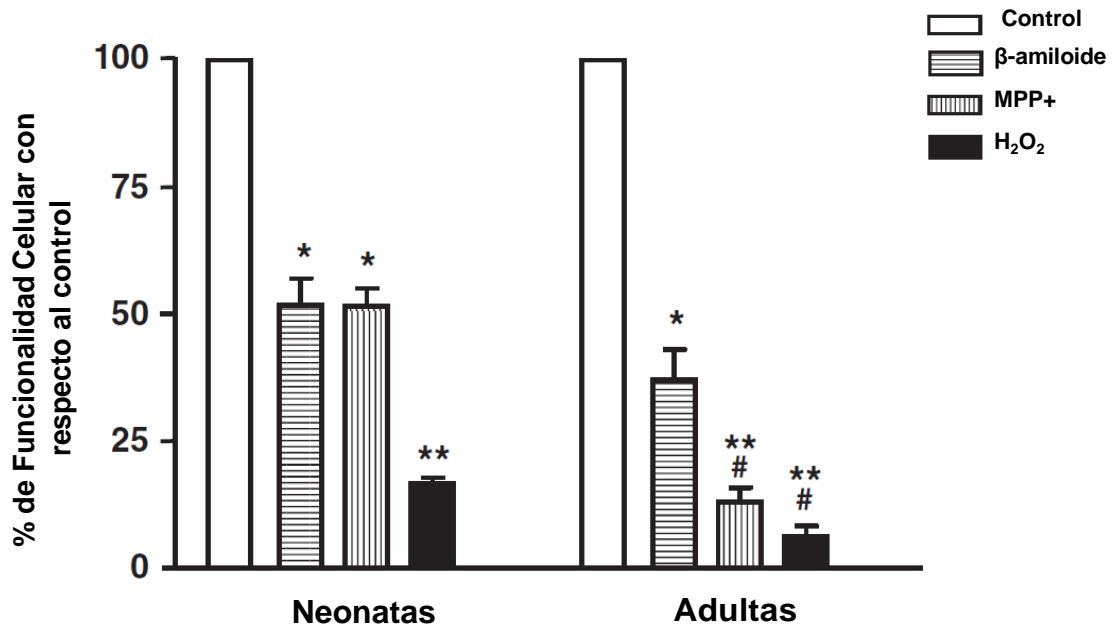
9.4 Efectos citotóxicos a tiempos cortos de exposición

Para evidenciar la posible respuesta diferencial de las células al efecto de los agentes tóxicos en los diferentes grupos de astrocitos evaluados, se realizaron los mismos experimentos a tiempos cortos de exposición. La Figura 5 muestra los datos obtenidos después de 5 h de exposición a las toxinas. En lo que se refiere al tratamiento con β -Amiloide, se observó una disminución en la viabilidad celular en un 40% y en la funcionalidad mitocondrial de aproximadamente el 60-70% cuando se compararon con respecto a las células control no tratadas (Figura 5A, 5B); no obstante, cuando la células provenientes de adultos fueron comparadas con las provenientes de neonatos, no presentaron diferencias significativas. En lo que se refiere al tratamiento con el MPP+ se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en los dos grupos analizados al compararlas con sus controles (50 y 55% respectivamente), pero cuando se compararon uno con el otro, no se observaron diferencias (Figura 5A). De manera interesante, cuando se analizó

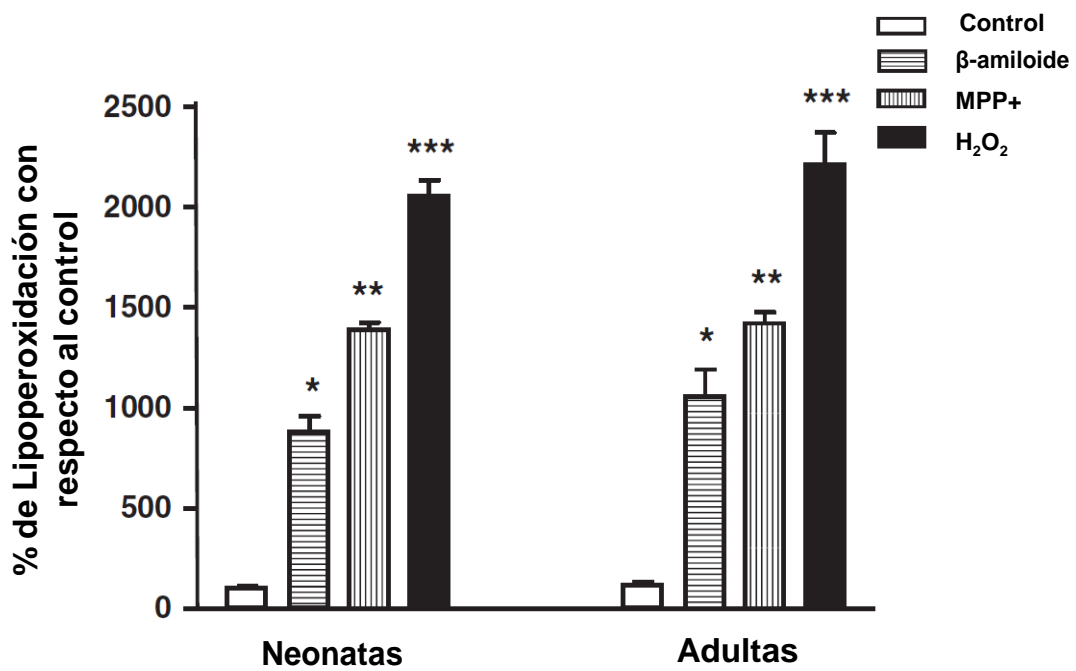
la funcionalidad mitocondrial, se observó una disminución significativa en los astrocitos tratados con MPP+ en comparación con sus respectivos controles, y de igual manera se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos experimentales. Los astrocitos provenientes de neonatos disminuyeron su funcionalidad mitocondrial en un 50%, mientras que los provenientes de adultos disminuyeron su funcionalidad mitocondrial aproximadamente en un 88%(Figura 5B). Un resultado similar fue observado en las células tratadas con H₂O₂, en las cuales se presentó una disminución en la funcionalidad mitocondrial mucho más evidente en las células provenientes de animales adultos. La Figura 5C muestra los resultados de los experimentos de lipoperoxidación después de la exposición de los astrocitos a los dos diferentes tóxicos. Se puede observar que ambas toxinas incrementaron el daño oxidante en lípidos cuando se compararon con respecto a las células control:β-amiloide (P<0.05), MPP+ (P<0.01) y H₂O₂ (P<0.001).

Para apreciar mejor las diferencias en cuanto a los agentes tóxicos utilizados, los extractos proteicos obtenidos después 5 h del tratamiento con las toxinas se corrieron en un gel para astrocitos provenientes de neonatos (Figura 6A) y otro de adultos (Figura 6B). Los resultados muestran que los astrocitos tratados con MPP+ y con H₂O₂ presentan niveles altos de daño oxidante, mientras que las tratadas con β-Amiloide muestran un daño oxidante moderado.





B



C

Figura 5. Efectos citotóxicos de exposición a tiempos cortos del β -Amiloide y del 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) sobre cultivos de astrocitos de rata. Viabilidad Celular (A), Funcionalidad mitocondrial (B) y Lipidoperoxidación (C) Fueron determinadas en cultivos primarios de astrocitos de la corteza cerebral provenientes de animales neonatos y adultos después de 5 horas de exposición con cada una de las toxinas, como fue descrito en materiales y Métodos. Cada punto representa la media \pm S.D. de 9 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto al control de células no tratadas fue considerada de la siguiente manera: *(P<0.05), **(P<0.01), ***(P<0.001). Las diferencias estadísticas entre adultos y neonatos fueron designadas con el símbolo # (P<0.05).

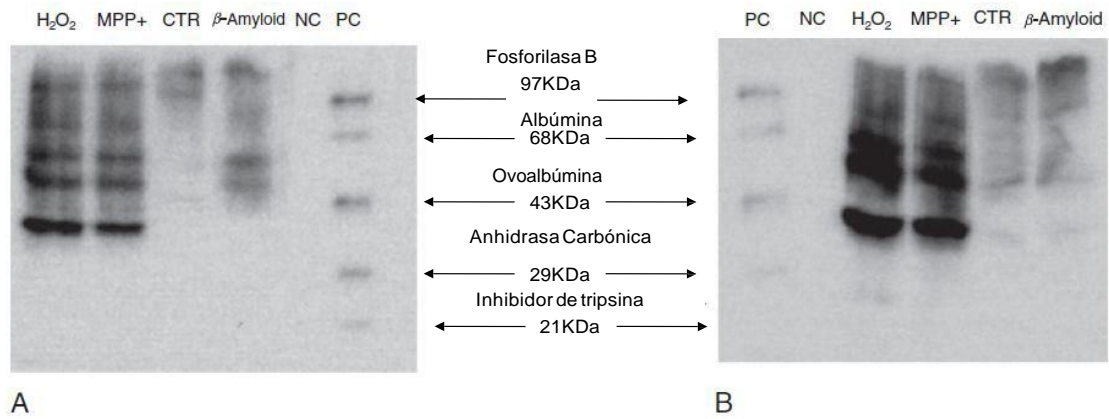


Figura 6: Determinación de los niveles de proteínas oxidadas después de la exposición por tiempos cortos al β -amiloide y al 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) en cultivos de astrocitos de ratas. Oxiblots representativos obtenidos de cultivos primarios de astrocitos de ratas neonatas (A) y adultas (B) Después de 5 horas de exposición a las toxinas β -Amiloide ,MPP+ y H2O2 (como control positivo de toxicidad oxidante). El control negativo (NC) y el control positivo (PC) son estándares internos provistos en el kit comercial. Los oxiblots fueron realizados 2 veces en tres experimentos independientes, como se describió en Materiales y Métodos.

9.5 Experimentos dosis-respuesta con tóxico MPP+ incluyendo astrocitos provenientes de ratas seniles

Los resultados presentados hasta este momento muestran que el MPP+ reduce la viabilidad y funcionalidad celular de manera más evidente que el β -amiloide, así mismo, se observaron diferencias entre los dos grupos analizados únicamente en los tiempos cortos de exposición (5 h), sugiriendo que a una exposición prolongada (72 h), las células presentan daños tan severos que es imposible observar diferencias entre los tratamientos analizados. Es por esto que en el afán de estudiar si existe una mayor susceptibilidad al tóxico MPP+ en los astrocitos en función de la edad, se aislaron astrocitos de ratas seniles (24 meses) para compararlos con astrocitos provenientes de ratas adultas y neonatas, pero empelando dosis bajas del tóxico (10, 25, 50 y 100 μ M) y reduciendo los tiempos de exposición (5, 3 y 1 h).

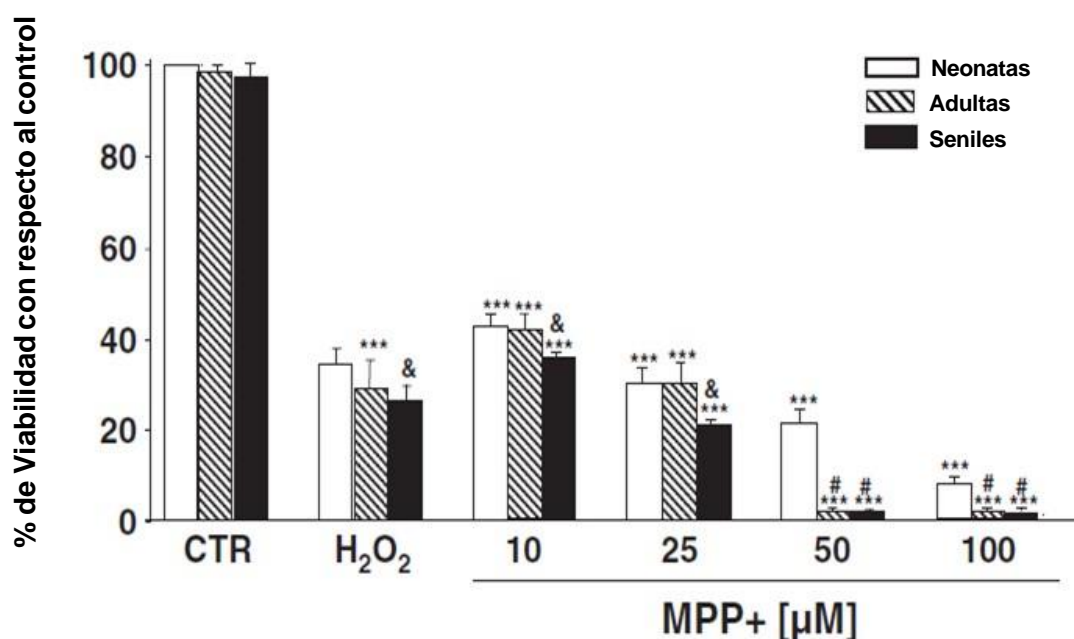
A partir de este momento, todos los experimentos que se realizaron en este trabajo fueron con tres grupos de edad y se identificarán en las figuras empelando la nomenclatura en inglés, que es la que se usó en el artículo:

1. OA a los provenientes de animales seniles (old astrocytes)
2. AA a los de ratas adultas (adult astrocytes) y
3. NA a los de neonatos (newborn astrocytes)

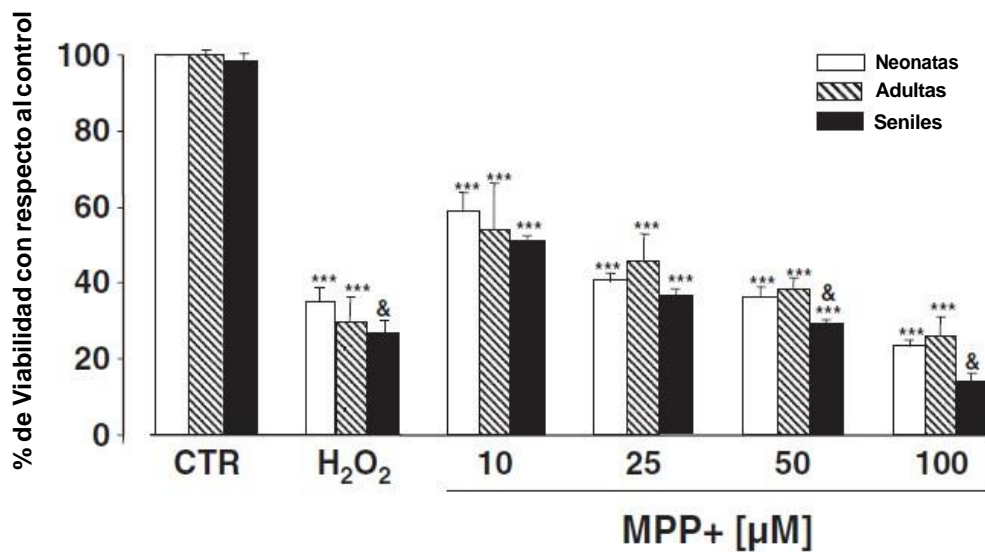
9.5.1 habilidad

Nuestros resultados muestran que las concentraciones altas de MPP+ (50 y 100 μM) por 5 y 3 h, siguen siendo tratamientos letales para los astrocitos OA y AA (95% de muertes) (Figura 7A, 7B). Así mismo, a las 5 h (Figura 7A), se puede observar que aún en la concentración más baja analizada (10 μM), 63% de los OA, y 57% de los AA y NA mueren, lo que indica que aunque se usen concentraciones más bajas, 5h de tratamiento siguen siendo letales.. Los experimentos realizados a las 3h tampoco muestran diferencias entre los grupos de edad, además de que se observa una elevada tasa de muerte (más del 50%) aún en los tratamientos con concentraciones bajas del tóxico.

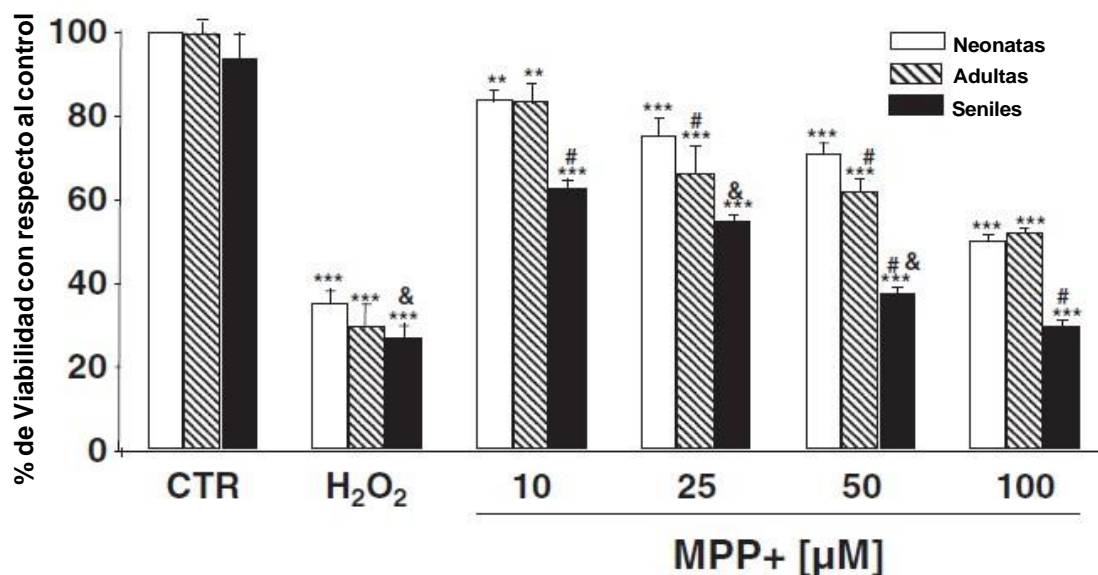
Finalmente, sólo durante el tratamiento con MPP+ a 1h fueron apreciables las diferencias entre los tres grupos analizados. Se observó que los OA muestran una elevada sensibilidad a la toxina incluso a bajas concentraciones (10 y 25 μM), mientras que una diferencia significativa entre los AA y NA sólo se observó en el tratamiento con 50 μM de MPP+. Específicamente, a 25 μM de MPP+, disminuyó la viabilidad en un 22% para NA, 35% para AA y 45% para OA ($p < 0.05$); mientras que en el tratamiento con 50 μM la viabilidad celular disminuyó 22% para NA, 35% para AA y 45% para OA ($p < 0.05$), y a 100 μM disminuyó en 30% para NA, 40% para AA y 60% para OA ($p < 0.05$) (Figura 7C).



7A



7B

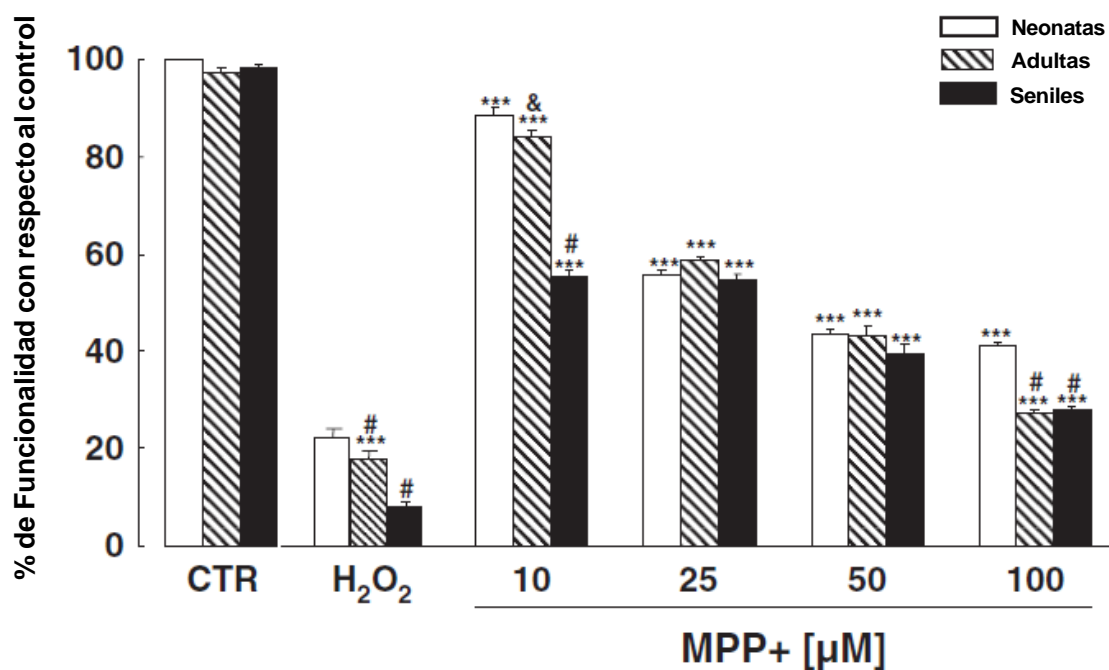


7C

Figura 7. Viabilidad Celular de astrocitos tratados con 1-metil-4-fenil piridinio (MPP+): Curva dosis respuesta. Cultivo de astrocitos primario provenientes de ratas neonatas, adultas y seniles fueron tratadas con diferentes concentraciones de MPP+ (10, 25, 50 and 100 μ M) for 5 (A), 3 (B) and 1 hora (C). La viabilidad celular fue determinada como se describió en material y métodos, y fue normalizada con respecto al cultivo de neonatos sin tratamiento como control, el cual fue considerado el 100%. El tratamiento con 100 μ M de H₂O₂ durante 1 hora fue considerado como control positivo del daño oxidante. Cada punto representa la media \pm la desviación Estándar de nueve determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto a las células no tratadas fue la siguiente: *(P<0.05),**(P<0.01),*** (P<0.001) . La diferencia estadística entre AA y OA vs. NA tratadas con la misma concentración de MPP+ fue señalizada con: & (P<0.05); La diferencia estadística entre AA vs. OA tratadas con la misma concentración de MPP+ fue señalada con: # (P<0.05).

9.5.2 ionalidad Celular

En concordancia con estos resultados, tampoco se observaron diferencias entre los grupos, en la funcionalidad celular en los tratamientos de 3 y 5 h (Figura 8A y 8B). Después de 5h de tratamiento con 10 μ M de MPP+, los OA muestran una disminución del 43% en la funcionalidad celular, mientras que en los AA y los NA sólo se observó una disminución del 17 y 10%, respectivamente. A concentraciones elevadas (100 μ M), los OA y AA disminuyeron su funcionalidad en 75% y los NA en un 60%. En contraste, después de 1 h de exposición a la concentración de 25 μ M, se observó una disminución en la funcionalidad celular de 10% en los NA, 20% en AA y 24% en los OA ($p < 0.001$) (Figura 8C).



8A

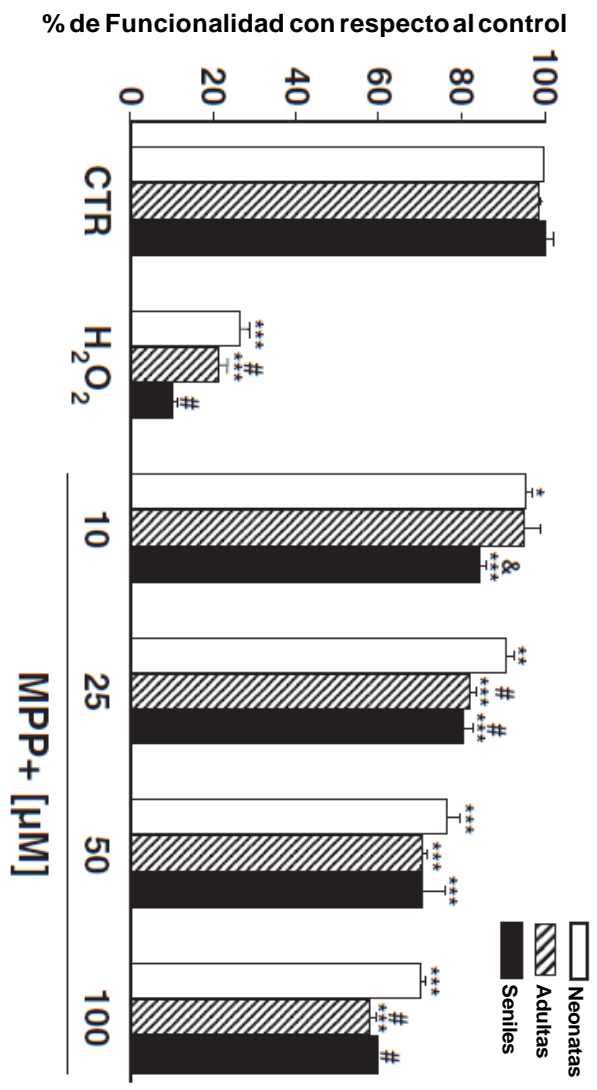
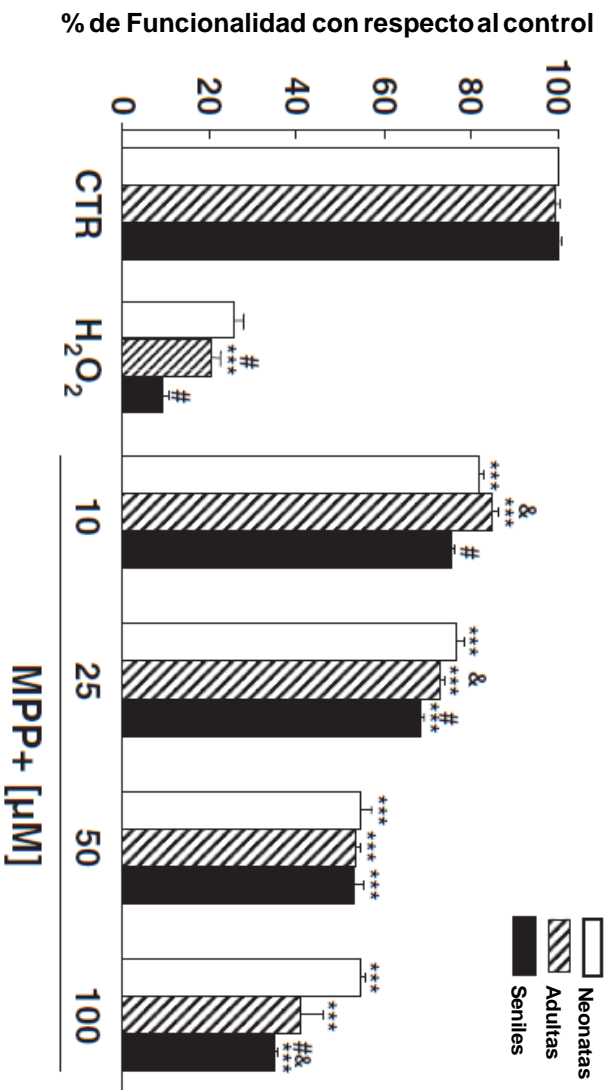
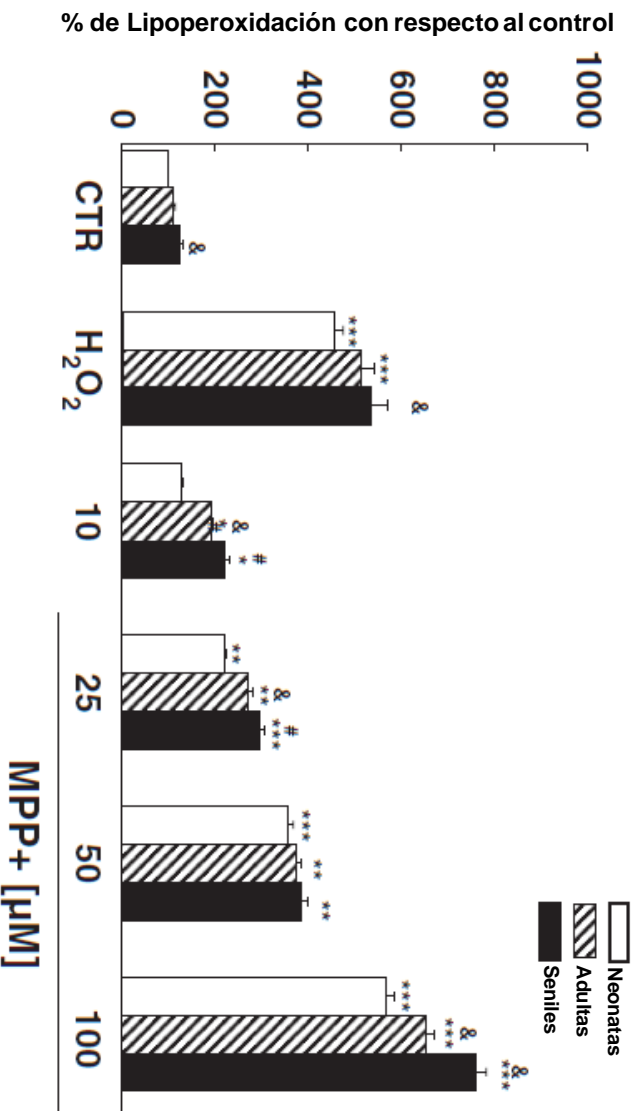
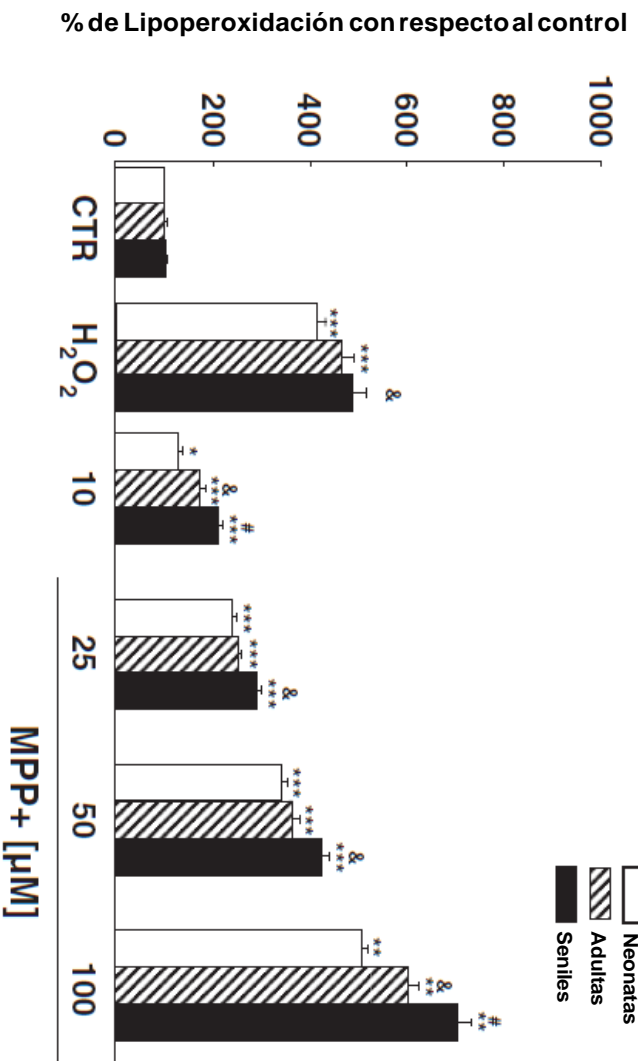
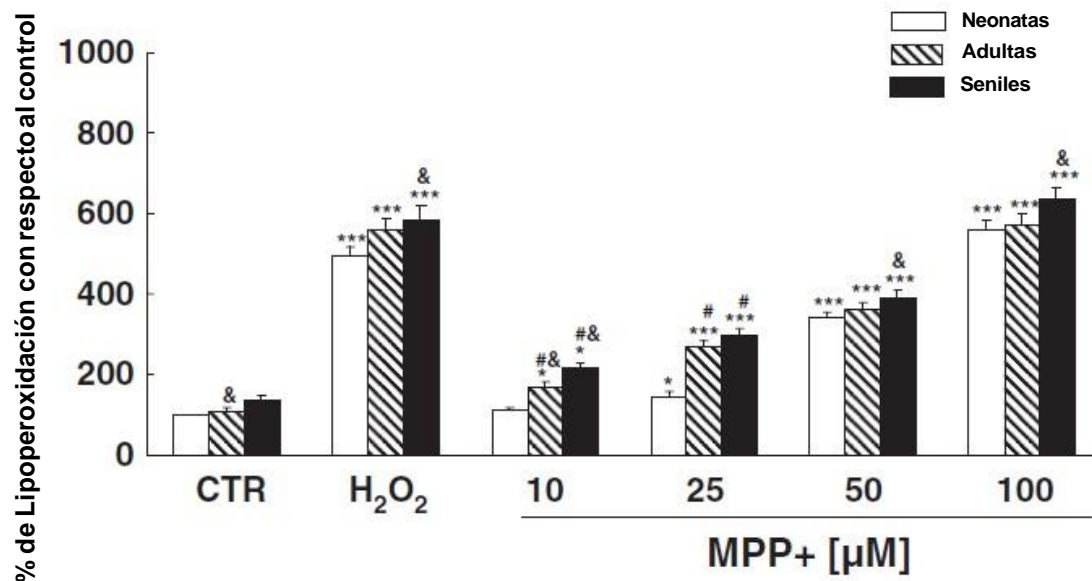


Figura 8. Funcionalidad Celular en astrocitos tratados con 1-Metil-4-fenil piridinio (MPP+): Curva dosis respuesta. Cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas, adultas y seniles fueron tratadas con diferentes concentraciones de MPP+ (10, 25,50 y 100 μ M), durante 5 (A), 3 (B) y 1 hora (C). La funcionalidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT como se describió en materiales y métodos, y fue normalizada con respecto a los NA como control, el cual fue considerado como el 100%. El tratamiento con 100 μ M de H₂O₂ durante 1 hora fue considerado como control positivo de daño oxidante. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DS) de nueve determinaciones en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto a las células no tratadas fue señalado como: *(P<0.05), **(P<0.01), *** (P<0.001). La diferencia estadística entre AA y OA vs. NA tratadas con la misma concentración de MPP + fue marcada como: & (P<0.05); Las diferencias estadísticas entre AA vs. OA tratadas con la misma concentración de MPP+ fue señalada con: # (P<0.05).

9.5.3 ño oxidante a lípidos

Posteriormente se realizaron experimentos de lipoperoxidación para determinar el daño oxidante a las concentraciones y tiempo de exposición del experimento anterior. Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la lipoperoxidación, el cual se puede observar desde la menor concentración analizada (Figura 9). De acuerdo con los datos previos obtenidos, se observan diferencias entre los grupos de edades, a partir del tratamiento de 1 hora con las concentraciones de 25 y 50 μ M de MPP+. Particularmente, la lipoperoxidación incrementa 0.5 veces en NA, 2.7 veces en AA y 3 veces en OA (p<0.001). Los astrocitos expuestos a 50 μ M de MPP+ incrementaron el daño oxidante en lípidos 3 veces en NA, 3.6 veces en AA y 3.9 veces en OA (p<0.001) (Figura 9C).





9C

Figura 9. Lipoperoxidación en astrocitos tratados con 1-Metil-4-fenil piridinio (MPP+): Curva dosis respuesta. Cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas, adultas y seniles fueron tratadas con diferentes concentraciones de MPP+ (10, 25, 50 y 100 μM), durante 5 (A), 3 (B) y 1 hora (C). La lipoperoxidación fue determinada como se describió en materiales y métodos, y fue normalizada con respecto a los NA como control, el cual fue considerado como el 100%. El tratamiento con 100μM de H₂O₂ durante 1 hora fue considerado como control positivo de daño oxidante. Cada punto representa la media ± la desviación estándar (DS) de nueve determinaciones en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto a las células no tratadas fue señalado como: *(P<0.05), **(P<0.01), *** (P<0.001). La diferencia estadística entre AA y OA vs. NA tratadas con la misma concentración de MPP + fue marcada como: & (P<0.05); Las diferencias estadísticas entre AA vs. OA tratadas con la misma concentración de MPP+ fue señalada con: # (P<0.05).

9.5.4 ño oxidante a proteínas

El daño oxidante a proteínas evaluado por el aumento en la concentración de grupos carbonilos aumentó 1.4 veces (p<0.01), 2.1 veces (p<0.01) y 2.5 veces (p<0.01) con respecto a los controles en los tratamientos con 25, 50 y 100μM de MPP+ respectivamente para los neonatos; para los adultos el incremento en carbonilos fue de 2.75 veces (p<0.01), 3 veces (p<0.01) , 7 veces (p<0.001) y 9 veces (p<0.001) con respecto al cultivo no tratado, para los tratamientos de 10, 25, 50 y 100μM de MPP+ respectivamente y para los seniles la diferencia en el incremento de proteínas oxidadas fue de 2.7 veces (p<0.01), 3.2 veces (p<0.01), 6 veces (p<0.001) y 13 veces (p<0.01) con respecto a los grupos no

tratados con las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM de MPP+ durante 1 hora (Figura 10).

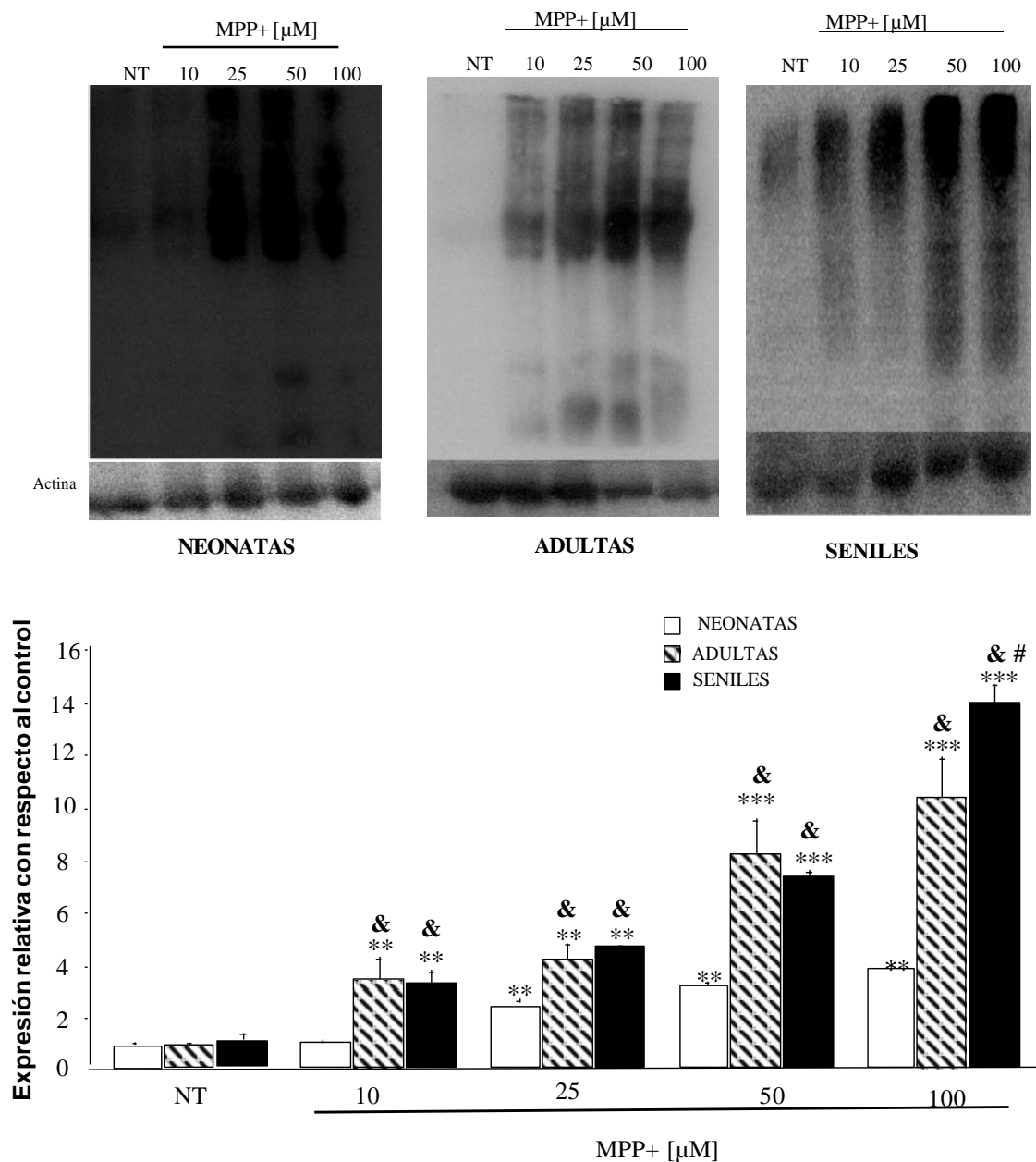


Figura 10. Determinación de carbonilos en astrocitos tratados con 1-Metil-4-fenil piridinio (MPP+): Curva dosis respuesta. Cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas, adultas y seniles fueron tratadas con diferentes concentraciones de MPP+ (10, 25, 50 y 100 μM), durante 1 hora. La determinación de proteínas oxidadas fue determinada mediante el ensayo Oxiblot como se describió en materiales y métodos, y fue normalizada con respecto a la expresión relativa de actina y se normalizó con respecto a los cultivos de NA como control, el cual fue considerado como el 100%. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DS) de nueve determinaciones en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto a las células no tratadas fue señalado como: *($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$). La diferencia estadística entre AA y OA vs. NA tratadas con la misma concentración de MPP + fue marcada como: & ($P < 0.05$); Las diferencias estadísticas entre AA vs. OA tratadas con la misma concentración de MPP+ fue señalada con: # ($P < 0.05$).

9.6 Incremento en la expresión de Nrf2

9.6.1 habilidad celular durante el tratamiento con tBHQ

Para tratar de contrarrestar el daño oxidante inducido por el MPP+, se empleó el antioxidante tBHQ que activa a Nrf2 e induce su expresión. Sin embargo, para determinar la dosis a emplear en los cultivos de astrocitos, se realizó una curva dosis-respuesta de tBHQ (10, 25, 50 y 100µM) durante 24 h. Los resultados muestran que un hubieron cambios significativos en la viabilidad celular de los NA durante los tratamientos con 10, 25 y 50µM de tBHQ, y las diferencias significativas se presentan únicamente en los tratamientos con 75 y 100µM, donde se observa una disminución de la viabilidad del 40 y 80% respectivamente. Por otra parte, se observó que los cultivos de AA y OA fueron más susceptibles al tratamiento con tBHQ, ya que los AA disminuyen su viabilidad en un 45, 65 y 85% en los tratamientos con 50,75 y 100µM respectivamente; mientras que los OA disminuyen 45, 88 y 92% durante esos mismos tratamientos. (Figura 11).

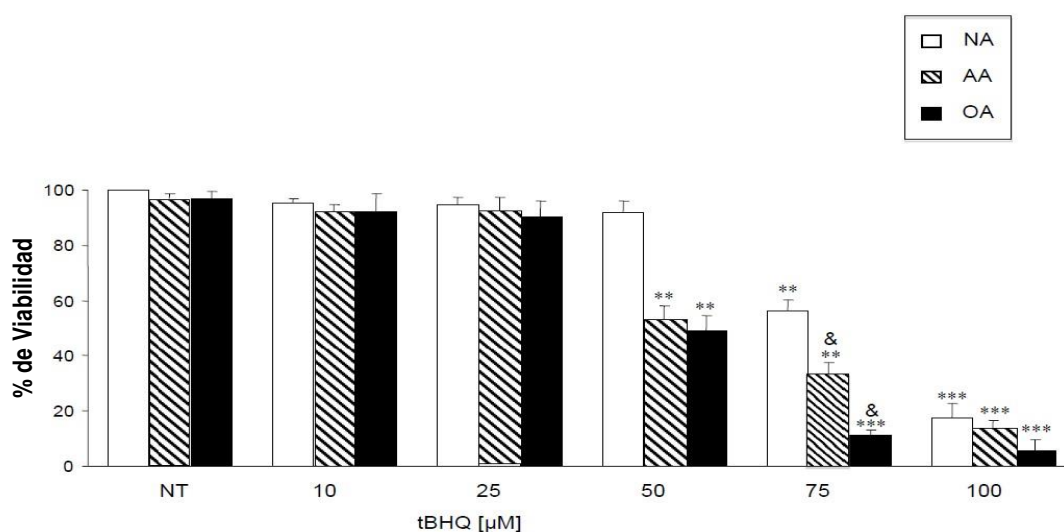
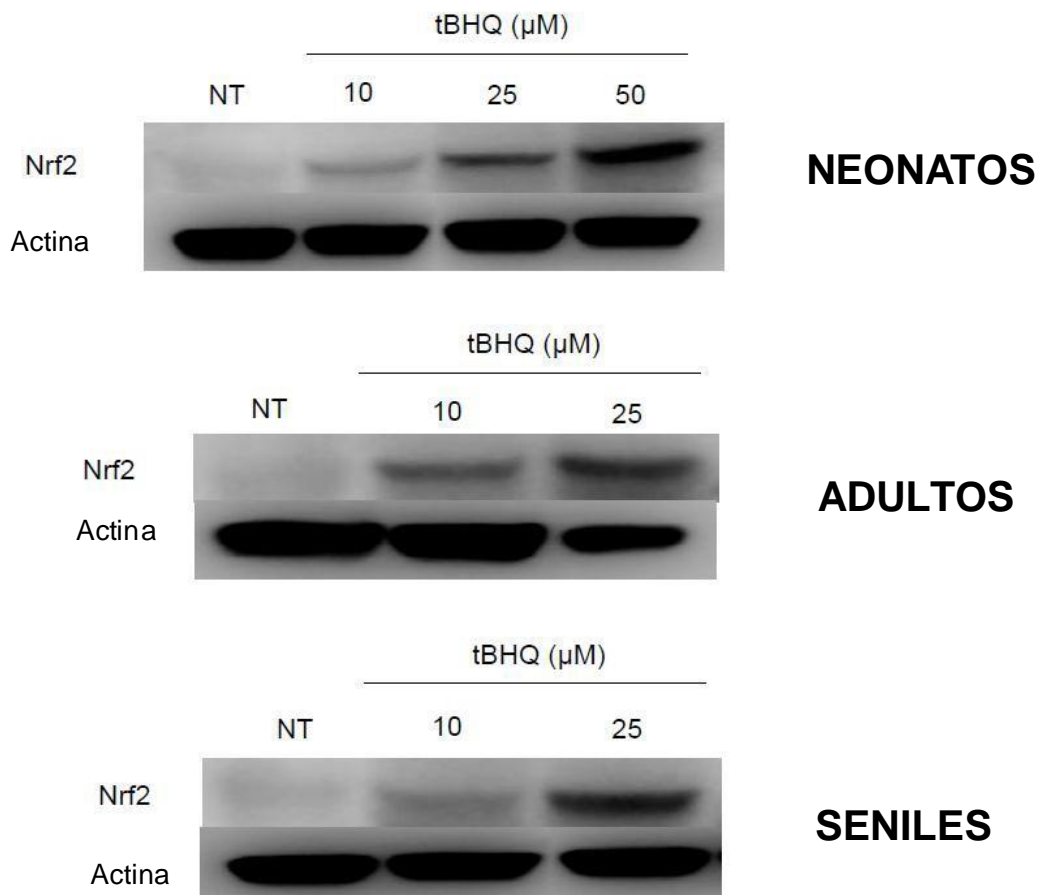


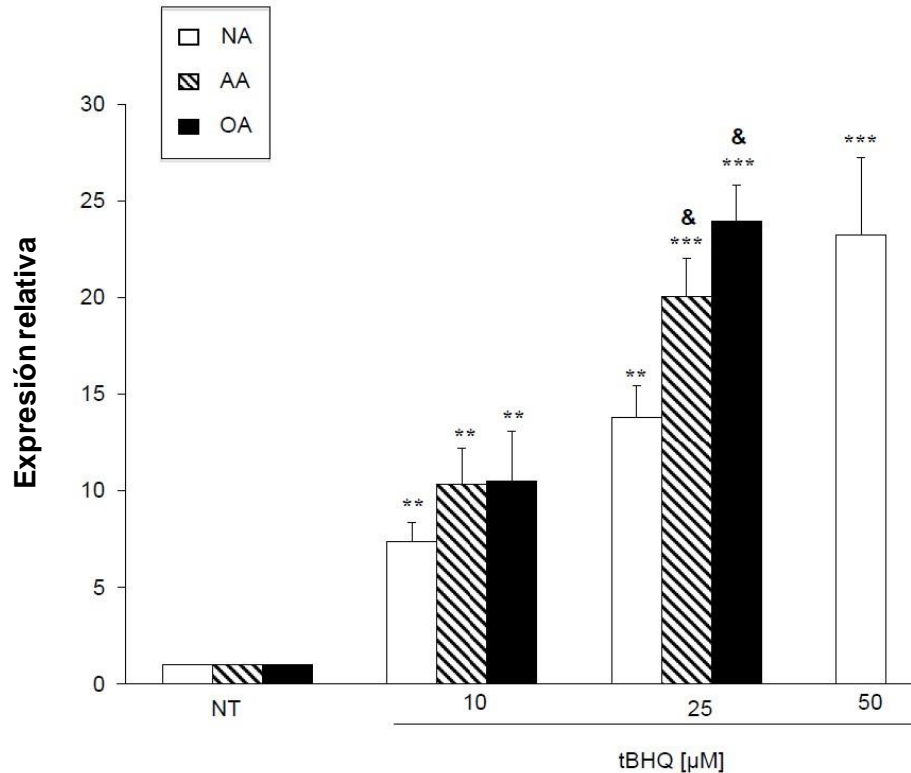
Figura 11: Viabilidad de astrocitos con tratamiento de tBHQ. Los astrocitos provenientes de Neonatas (NA), Adultos (AA) y Seniles (OA), fueron tratados con tBHQ durante 24 horas y posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul tripano como se describió en materiales y métodos. Los datos se normalizaron con respecto al cultivo de NA no tratados el cual fue considerado el 100%. %. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DS) de nueve determinaciones en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto a las células no tratadas fue señalado como: *(P<0.05), **(P<0.01), ***(P<0.001). La diferencia estadística entre AA y OA vs. NA tratadas con la misma concentración de MPP+ fue marcada como: & (P<0.05);

9.6.2 expresión de Nrf2 total

Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión de Nrf2total en los astrocitos tratados sólo con aquellas concentraciones en las que no se modificó la viabilidad celular. Los cultivos primarios de NA tratados tBHQ presentaron un incremento en la expresión relativa Nrf2 de 7 veces en la concentración de 10 μ M ($p < 0.01$), 13 veces con 25 μ M ($p < 0.01$) y 23 veces con 50 μ M ($p < 0.001$) con respecto de su control no tratado. Los cultivos de AA incrementaron sus niveles de Nrf2 significativamente 9 veces ($p < 0.01$) y 19 veces ($p < 0.001$) con 10 y 25 μ M de tBHQ respectivamente. Finalmente los astrocitos OA presentan un incremento de 9 veces en los tratamientos con 10 μ M ($p < 0.01$) y de 24 veces ($p < 0.001$) con 25 μ M tBHQ (Figura 12A y 12B).



12A



12B

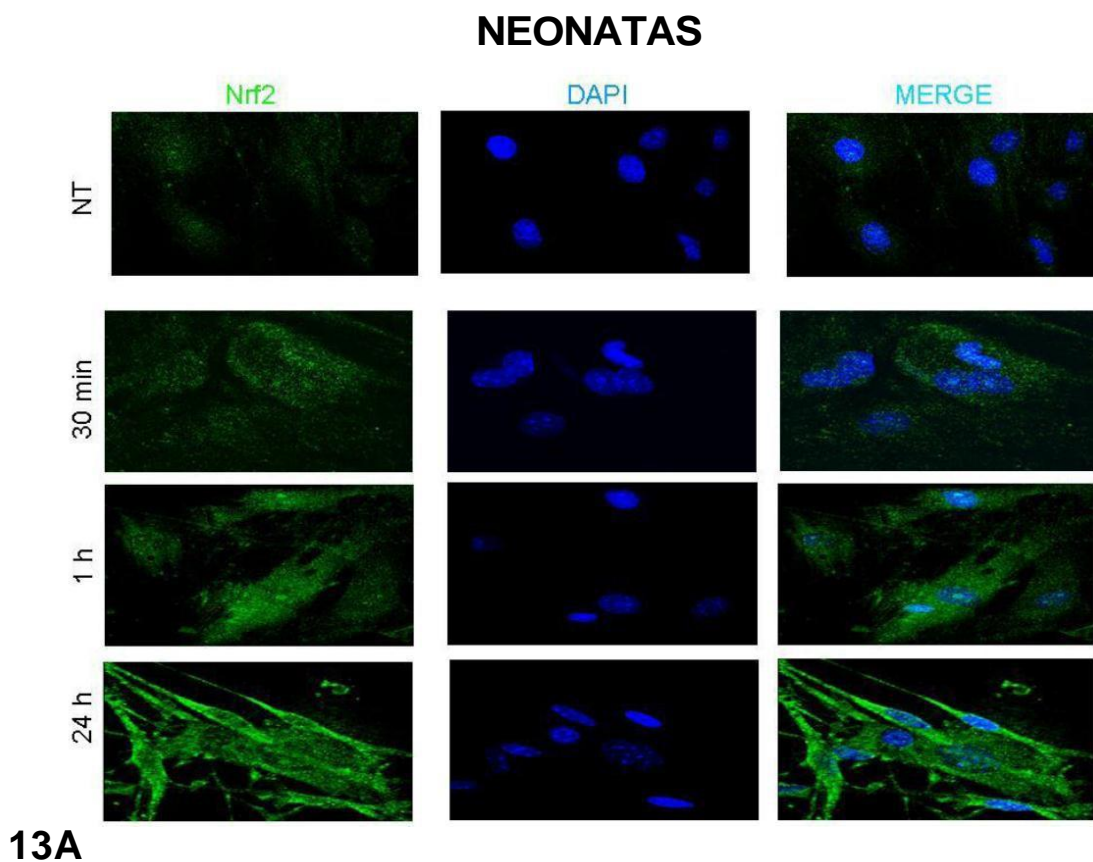
Figura 12. Expresión de Nrf2 en astrocitos tratados con tBHQ. Los NA, AA y OA fueron expuestos a diferentes concentraciones de tBHQ (10, 25 y 50µM para NA y 10 y 25µM para los AA y OA) durante 24 horas. Posteriormente se determinó la expresión relativa de Nrf2 mediante Western blot, como se describió en Materiales y Métodos. A) Western Blot representativo de la expresión de Nrf2. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de Nrf2. Los resultados presentados son la media ± la DS de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue señalada con respecto a las células no tratadas con: (P<0.05), ** (P<0.01), *** (P<0.001). La diferencia estadística entre los tratamientos con tBHQ fue marcada como: & (P<0.05);

9.7 tBHQ induce la translocación nuclear de Nrf2

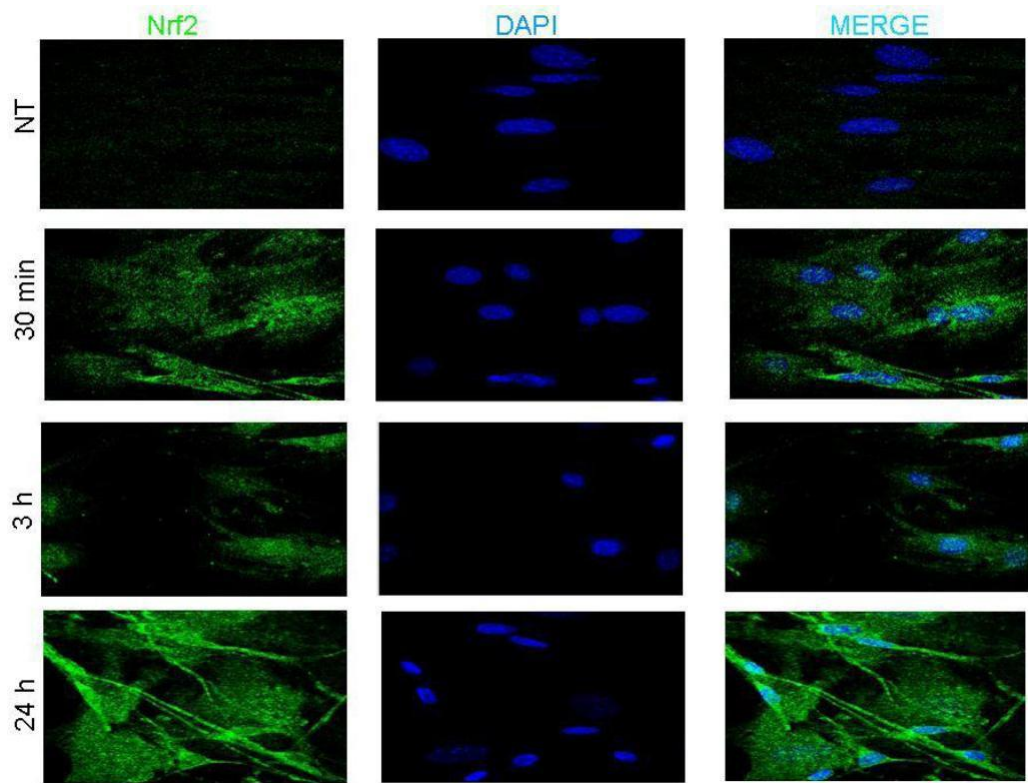
La translocación nuclear fue determinada mediante inmunofluorescencia a diferentes tiempos posteriores a la exposición de tBHQ, iniciando desde los primeros 30 min hasta 24 h, (0.5, 1, 2, 3, 6, 12, y 24 horas). Aunque se evaluó la translocación a los tiempos mencionados, en la Figura 13 únicamente se muestran algunas imágenes representativas de diferentes tiempos seleccionados en orden creciente, para los diferentes grupos estudiados: NA (Fig. 13A), AA (Fig.13B) y OA (Fig.13C). Se puede observar que en general, los niveles de Nrf2 están incrementados desde los primeros tiempos evaluados y se mantienen altos hasta las 24 h. Así mismo se observa la presencia de Nrf2 en el núcleo en las primeras 4 horas posteriores al tratamiento con tBHQ, está

presencia de Nrf2 en el núcleo se mantiene durante todo el tratamiento, especialmente en los NA y AA.

Para analizarla translocación nuclear de Nrf2, se marcó el DNA con DAPI y se determinaron la co-localización de este factor en el núcleo utilizando el programa ZEN 2010 con la versión 6.0. La Figura 13D muestra los resultados de la co-localización de Nrf2 en una gráfica representativa de un análisis en un plano, empleando los datos de todos los tiempos analizados. Como se había mencionado, se observa un incremento en la expresión de Nrf2 en todos los puntos evaluados, cuando se les compara con los no tratados. Las imágenes muestran un evento dinámico en cuanto a la presencia de Nrf2 en el núcleo, ya que pareciera que en momentos tiende a salir, no obstante es sorprendente que este factor de transcripción se encuentre localizado por tiempos tan prolongados en el núcleo. El hecho de encontrar niveles tan elevados de Nrf2 en el citosol sugieren un probable proceso de síntesis *de novo*, por lo que estos resultados concuerdan con Western blot de los niveles de expresión de Nrf2 presentado en la figura 12B.

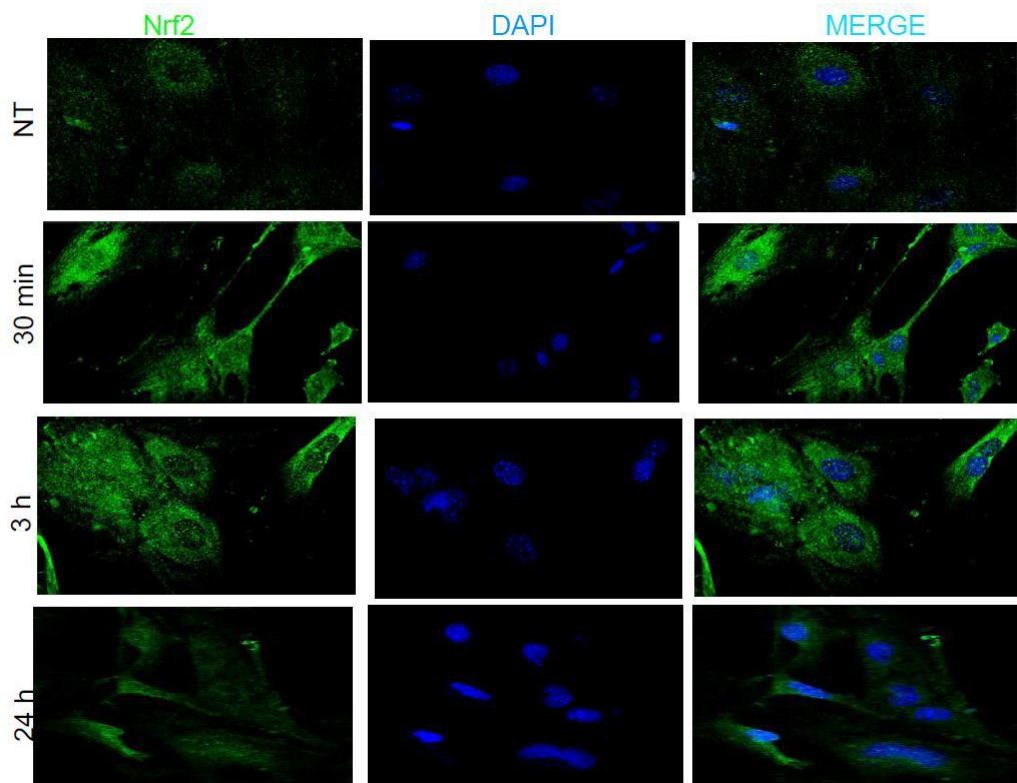


ADULTAS

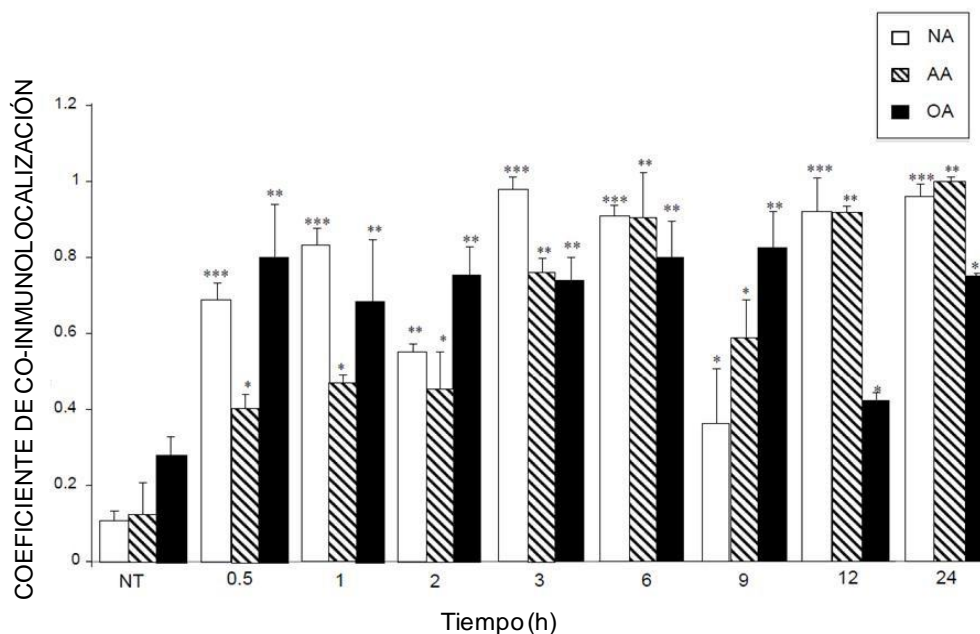


13B

SENILES



13C



13D

Figura 13: Translocación Nuclear de Nrf2 después del tratamiento con tBHQ. Los astrocitos primarios fueron tratados con tBHQ durante 24 horas y se realizó un ensayo inmunohistoquímico a diferentes intervalos de tiempo (0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 24 h). La figura muestra tres puntos representativos de la translocación nuclear de Nrf2 mediante la técnica de microscopía confocal y analizada con el software ZEN 2010 de Carl Zeiss.

A: La microscopía confocal muestra imágenes representativas de la translocación nuclear de Nrf2 en cultivos primarios de astrocitos de recién nacidos (NA) a los 30 minutos, 1 y 24 horas.

B: Las micrografías confocales muestran tiempos representativos de la translocación nuclear de Nrf2 en cultivos primarios de astrocitos de adultos (AA) a los 30 minutos y a las 3 y 24 horas.

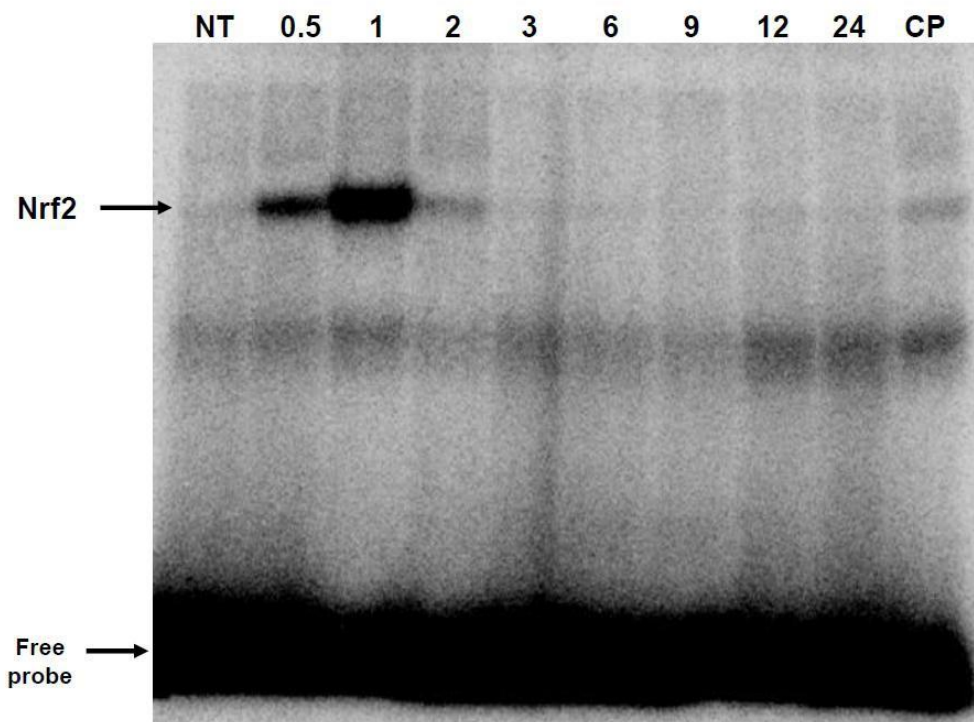
C: Las imágenes muestran tres tiempos representativos de la translocación nuclear de Nrf2 en cultivos de astrocitos sénilles después del tratamiento con tBHQ a los 30 minutos y a las 3 y 24 horas.

D: La figura muestra el análisis de la co-inmunolocalización nuclear de Nrf2 (Verde) con el marcador de DNA DAPI (Azul), la gráfica muestra el análisis de todos los tiempos evaluados (0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12 and 24 h) después del tratamiento con tBHQ. El análisis se realizó en un sólo plano mediante el software Zen 2010 versión 6.0. Cada punto representa la media D.S. de tres determinaciones realizadas en experimentos independientes. NA (Barras en blanco), AA (Barras asuradas), OA (Barras en negro). La significancia estadística fue determinada con respecto a cada uno de los cultivos no tratados (NT): * (P<0.05), ** (P<0.01) y *** (P<0.001).

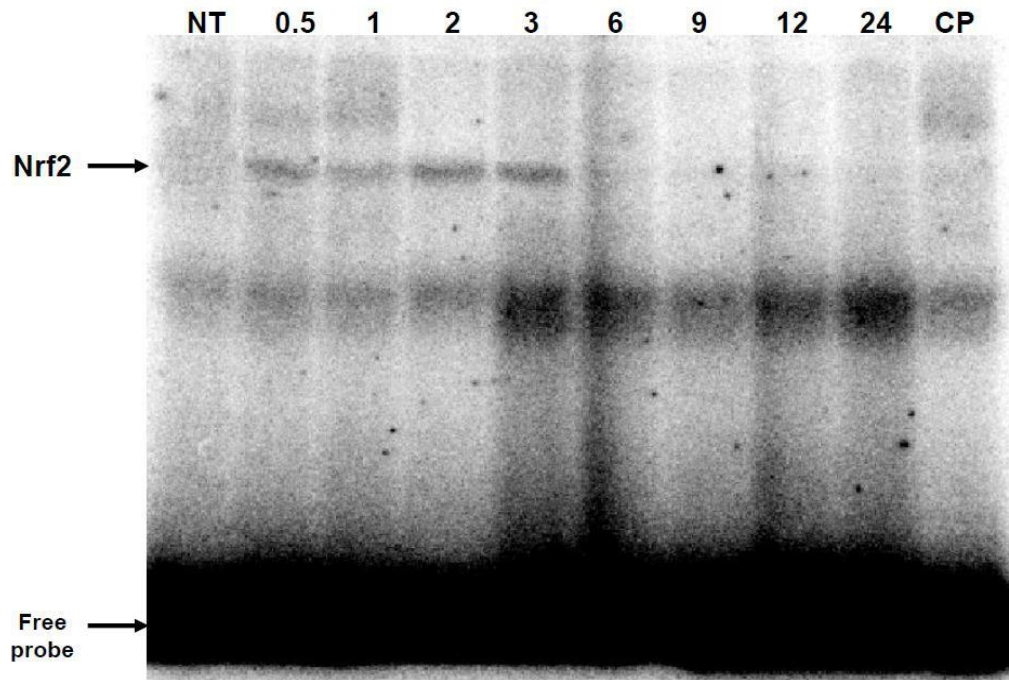
9.8 Nrf2 se encuentra unido a su elemento de respuesta en el DNA (ARE) únicamente en tiempos cortos

Puesto que se encontró que Nrf2 permanecía en el núcleo por tiempos prolongados, se decidió determinar si durante su presencia en el núcleo, Nrf2 se encontraba unido a su secuencia consenso en el DNA, el elemento ARE, mediante un ensayo de EMSA, durante todos los tiempos evaluados anteriormente. Los resultados de la figura 14 muestran que Nrf2 sólo encuentra unido a su secuencia de DNA a tiempos cortos. En particular en NA, Nrf2 se encuentra unido a su secuencia ARE desde los 30 min y hasta las 2 h, con un punto máximo a la hora (Figura 14A), mientras que en los AA se observa una activación más prolongada de Nrf2, que va desde los 30 min y hasta las 3 h

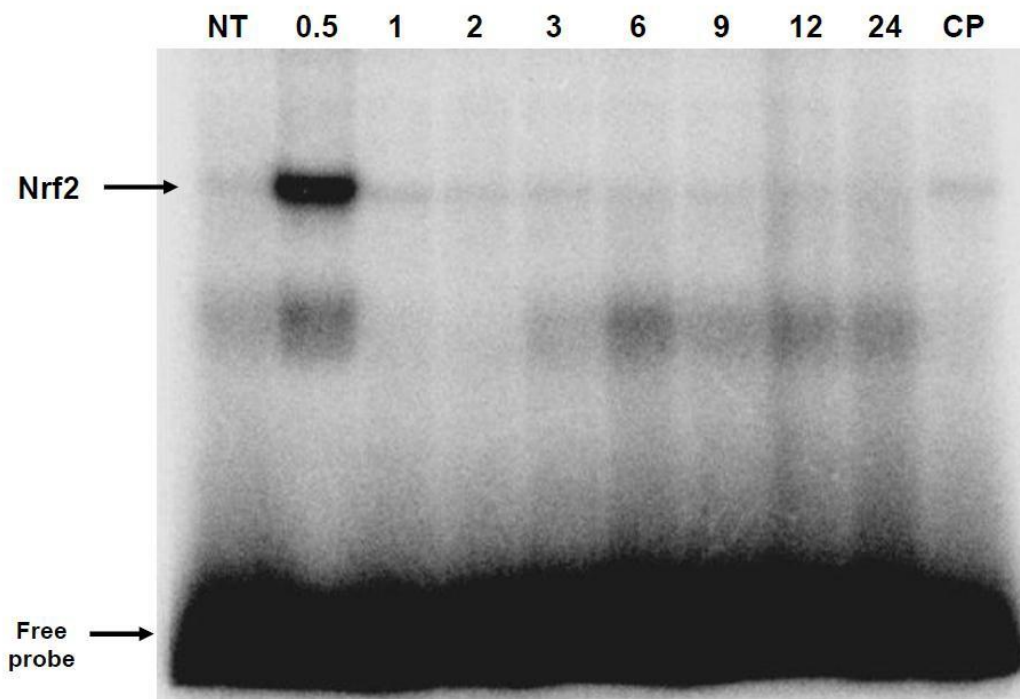
(Figura 14B). En OA, Nrf2 sólo se observa activa por un corto periodo de tiempo a los 30 min (Figura 14C). De modo que, aunque Nrf2 permanece en el núcleo durante 24 h, la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 sólo se presenta durante periodos cortos posteriores a la exposición con tBHQ.



14A



14B



14C

Figure 14. Nrf2 unido a su elemento de respuesta en el DNA.

La unión de Nrf2 a su elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el DNA fue determinada mediante un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

A. La figura representa la unión de Nrf2 a ARE en cultivos de astrocitos NA tratados con tBHQ (50 μ M) y evaluado a diferentes tiempos 0.5, 1, 2, 3, 6, 9 12 y 24 h.

B. Un EMSA representativo de cultivos primarios de AA tratados con tBHQ (25 μ M) durante 0.5, 1, 2, 3, 6, 9 12 and 24 h.

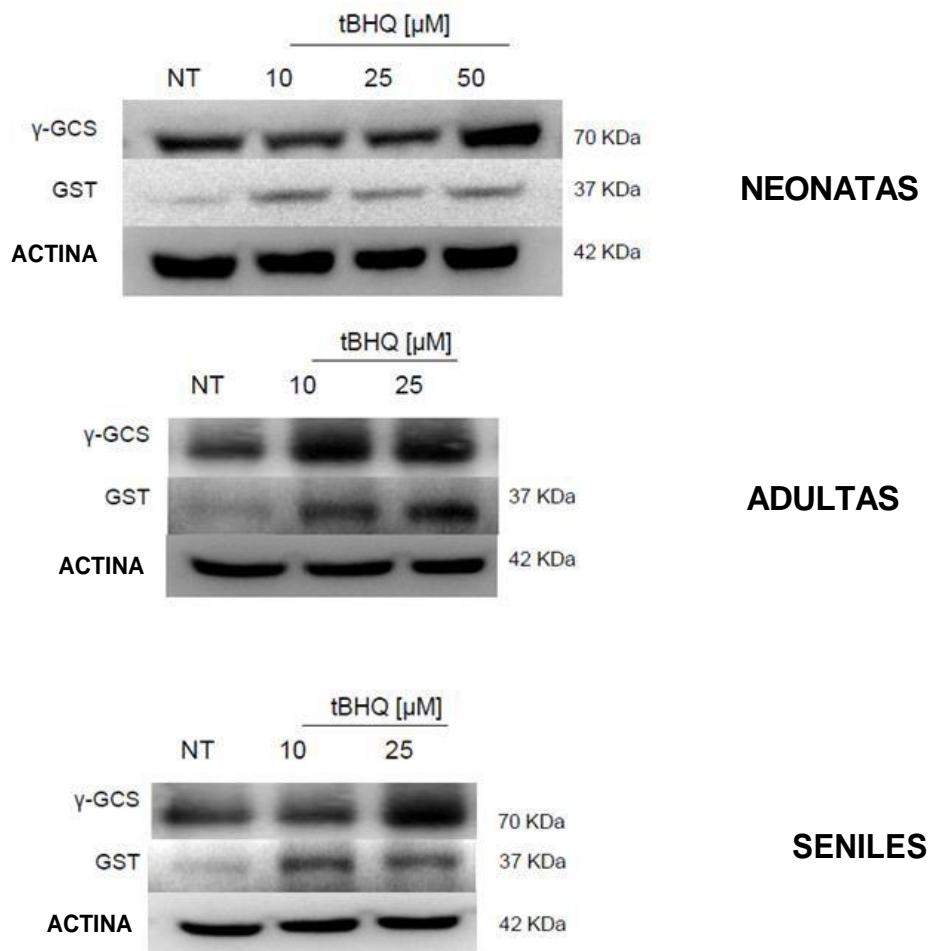
C. Imágen representaiva de un EMSA de cultivos primarios OA tratados con tBHQ (25 μ M) durante 0.5, 1, 2, 3, 6, 9 12 and 24 h.

NT representa la células no tratadas. El ensayo de unión a la sonda no marcada (CP) fue realizada utilizando 90 % de la sonda no marcada y 10% de la sonda marcada. Las figuras representan los gels de tres experimentos independientes.

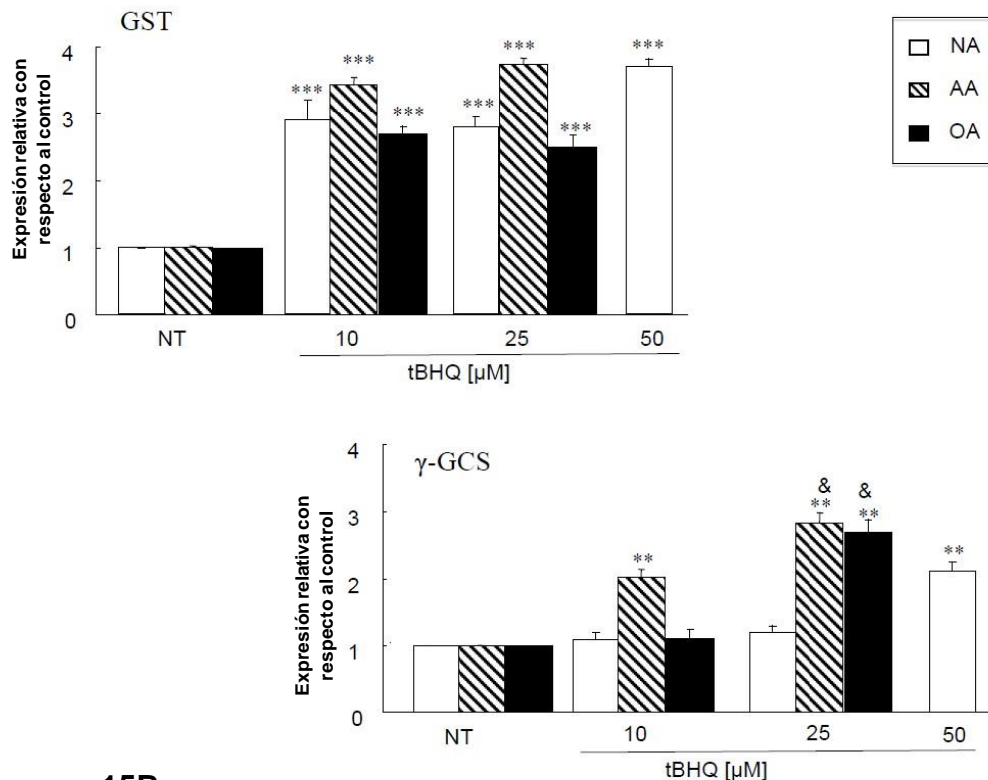
9.9 Incremento en la expresión de γ -GCS y GST

Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes proteínas involucradas en la respuesta celular antioxidante, entre las que destacan la gamma glutamil cisteinasintetasa (γ -GCS) una enzima clave en la regulación de la síntesis *de novo* de GSH y la glutationsulfidril transferasa (GST) una enzima muy importante en la respuesta antioxidante de la fase 2 de detoxificación. Al evaluar los niveles de expresión de dichas enzimas se encontró un incremento de la enzima GST en los cultivos de NA con respecto a su control no tratado en 2, 1.8 y 2.5 veces en los tratamientos con 10, 25 y 50 μ M de tBHQ respectivamente; mientras que los niveles la γ -GCS se incrementaron solo en una vez, durante en el tratamiento con 50 μ M de tBHQ (Figura 15B). Los cultivos de AA, presentaron un incremento del 2.4 y 2.7 veces

en la expresión de la GST ($p < 0.001$) y del 1.2 y 1.8 veces en la expresión de la γ -GCS ($p < 0.01$) en los tratamientos con 10 y 25 μM de tBHQ respectivamente (Figura 15B). En OA, GST aumentó 1.6 y 1.4 veces ($p < 0.01$) en los tratamientos con 10 y 25 μM respectivamente, y no se observó una diferencia significativa entre ambos tratamientos. Finalmente el tratamiento con 25 μM incrementó los niveles de γ -GCS de manera significativa en un 1.60 veces ($p < 0.01$) con respecto a su control (Figura 15B).



15A



15B

Figura 15. Respuesta antioxidante en astrocitos pre-tratados con tBHQ.

A. Los astrocitos primarios obtenidos de organismos de diferentes edades fueron pre-tratados con diferentes concentraciones de tBHQ durante 24 horas y posteriormente se determinó los niveles de expresión de las enzimas reguladas por Nrf2 como lo son GST y γ -GCS mediante western blot.

B. La gráfica representa el análisis densitométrico normalizado con la expresión relativa de Actina como control de carga, además para la normalización se consideró a la células no tratadas como control y fueron consideradas el 100% en cada uno de los cultivos analizados. Cada punto representa la media D.S. de tres determinaciones realizadas en experimentos independientes. NA (Barras blancas) AA (Barras asuradas) y OA (Barras negras). La significancia estadística fue considerada con respecto a las células NT: *($P < 0.05$), **($P < 0.01$); la diferencia entre grupos fue determinada con respecto a las células NT de los cultivos de NA y marcada con & ($P < 0.05$).

9.10 El pre-acondicionamiento con tBHQ incrementa los niveles de GSH y protege a los astrocitos de animales viejos de la toxicidad del MPP+

Aún y cuando los resultados mostraron que la inducción de Nrf2 mediante el tratamiento con tBHQ logró incrementar los niveles de expresión de algunas proteínas relacionadas a la respuesta antioxidante en los OA, era necesario determinar si dicho pre-acondicionamiento era capaz de proteger a los OA de la toxicidad del MPP+.

Para determinar el estado redox en los astrocitos pre-tratados con tBHQ se evaluó el cociente GSH/GSSG (Figuras 16A, 16B y 16C). Los niveles de GSH incrementaron 2.5 veces en OA y 3.5 veces en AA, después del pre-tratamiento con 25 μ M de tBHQ, mientras que un aumento de solo 10% fue observado en NA (Figura 16A); no obstante cuando se trataron esas mismas células con 50 μ M, el aumento fue de 2.5 veces (Inserto en la figura 16A).

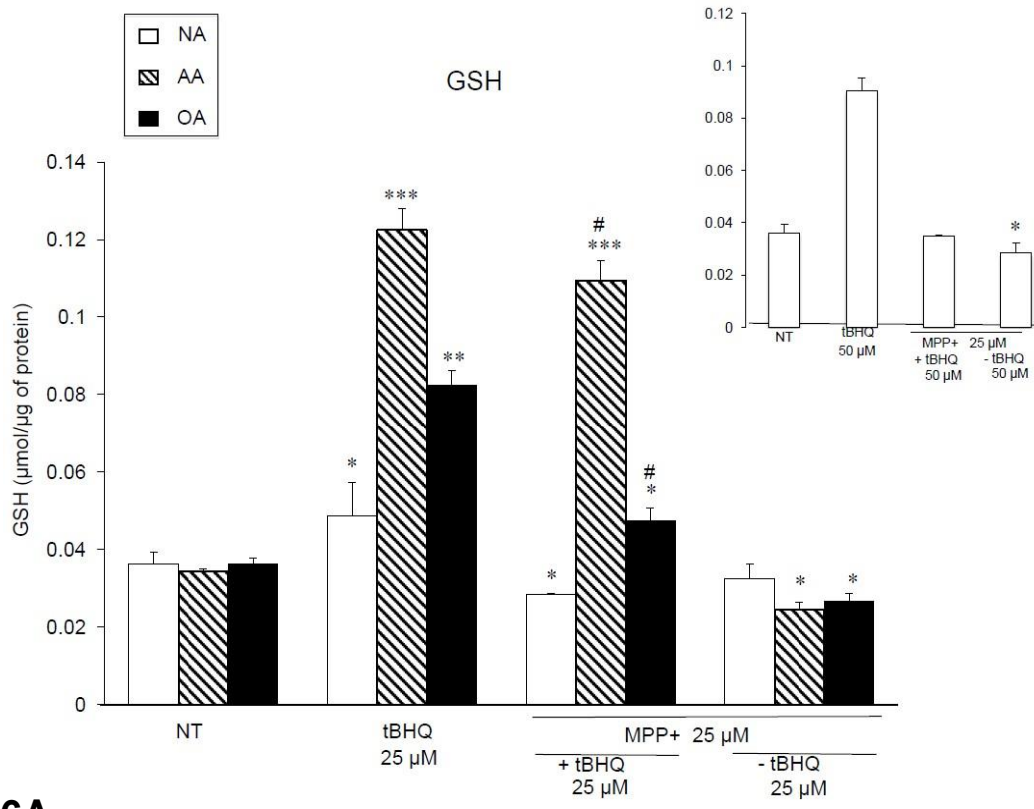
Ahora bien, cuando las células se expusieron al tóxico MPP+ (25 μ M por 1 h), todos los tipos celulares evaluados mostraron un estado redox más oxidado (Figura 16C), principalmente por un incremento en los niveles de GSSG (Figura 16B). De manera interesante, se encontró un incremento de más de 2 veces de GSSG en OA (Figura 16B barras negras).

Para determinar los cambios en el estado redox inducidos por el tBHQ, las células fueron pre-tratadas por 24 h con tBHQ y posteriormente se les agregó el MPP+ por 1 h. Los resultados mostraron una protección en las células que fueron pre-tratadas con tBHQ. Notablemente, los AA incrementaron los niveles de GSH (barras rayadas Figura 16A) manteniendo el estado redox en un estado reducido, aún más reducido que los astrocitos control (barras rayadas en la figura 16C) ($P < 0.001$). Finalmente, como se mencionó antes, aunque el MPP+ incrementó drásticamente los niveles de GSSG en los OA (Barras negras en la figura 16B), también hay un incremento en los niveles de GSH debido a la estimulación con tBHQ (Barra negra en la figura 16A), lo cual logró mantenerlos niveles redox normales. En el caso de los cultivos de NA tratados con 50 μ M de tBHQ, el índice GSH/GSSG permaneció de una manera similar a los controles no tratados de astrocitos (Figura 16C).

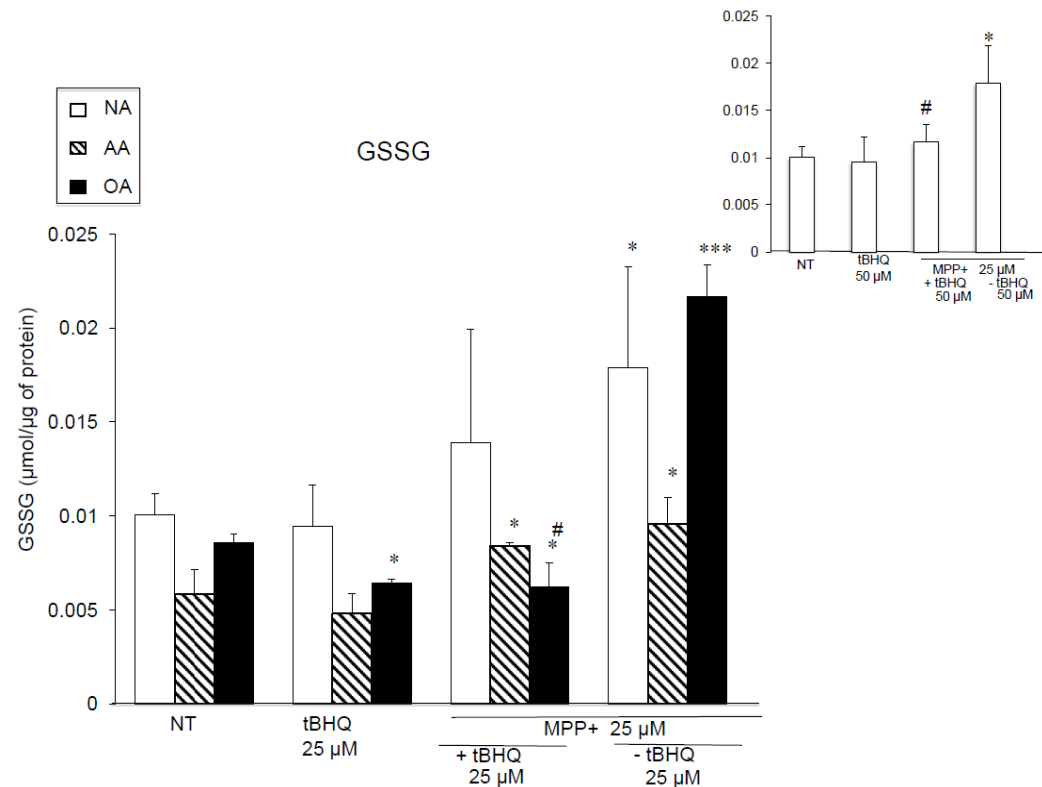
Para verificar el estado fisiológico y la participación de la vía tBHQ/Nrf2/ARE en la protección contra los daños oxidantes, se determinó la viabilidad celular en astrocitos pre-tratados con 25 μ M de tBHQ y posteriormente expuestos a 25 μ M de MPP+ durante 1h. La figura 17 muestra el porcentaje de células viables después del tratamiento a estas condiciones. Los AA presentaron un incremento significativo de sobrevivencia del 45% cuando se les compara con los astrocitos no pre-tratados, mientras que la protección contra la muerte celular en OA fue de alrededor del 60% ($p < 0.05$). Consistentemente con los datos previos presentados, los NA pre-tratados con 25 μ M de tBHQ no

mostraron un efecto protector, pero cuando se trataron con 50 μ M de tBHQ, se observó 30% de protección (Inserto figura 17).

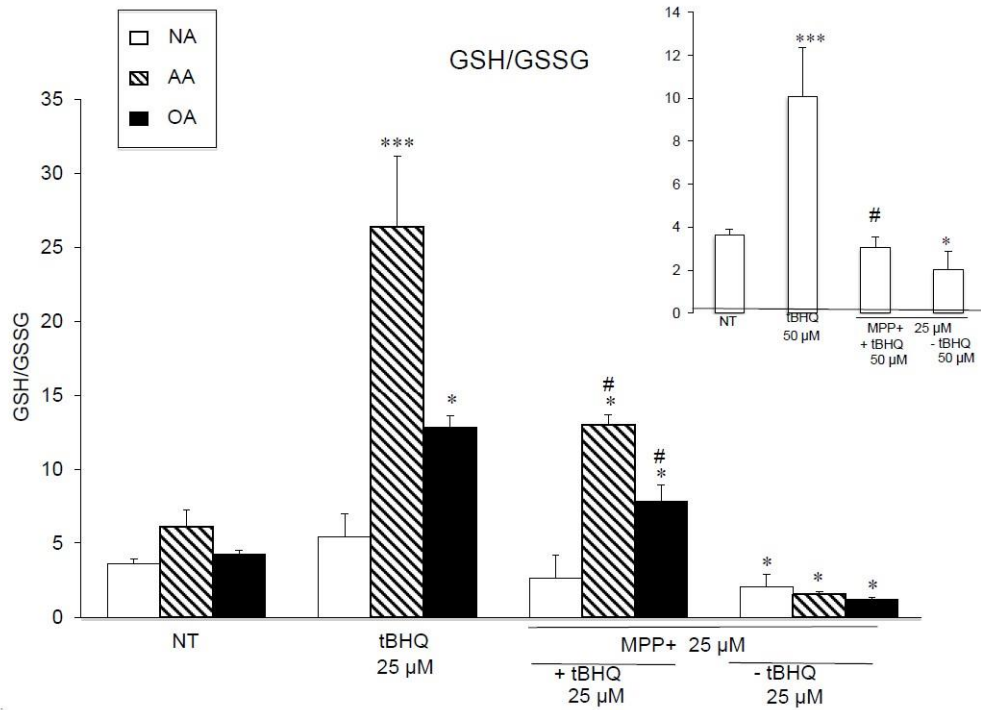
Estos resultados muestran que aún y cuando los OA fueron más susceptibles a la toxina (mayor muerte celular observada a 25 μ M de MPP+: 30% NA, 38% AA y 52% OA), el pre-tratamiento con tBHQ fue capaz de activar la vía Nrf2 y proteger a las células de una manera moderada contra el daño oxidante.



16A



16B



16C

Figura 16. Índice GSH/GSSG

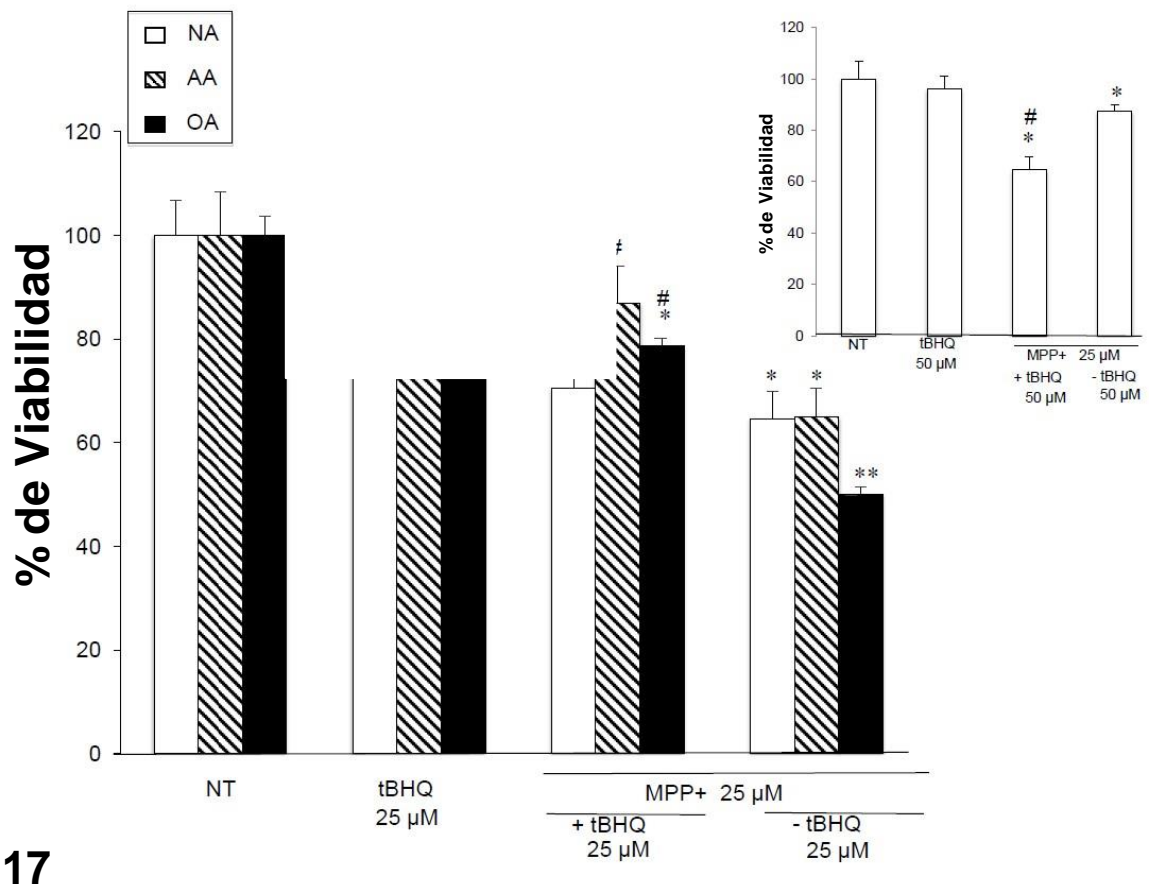
Los cultivos primarios de astrocitos fueron pre-tratados con 25μM tBHQ durante 24 h y posteriormente se les administró un tratamiento de 1 h del tóxico MPP+ con una concentración de 25 μM.

A. La concentración de GSH fue determinada por fluorimetría como se describió previamente y normalizada por μg de proteína.

B. La concentración de GSSG fue determinada por fluorimetría como se describió previamente y normalizada por μg de proteína.

C. La gráfica representa el cociente entre la concentración de GSH/GSSG

El inserto en las figuras representa el tratamiento de cultivo primario de NA pre-tratados con 50 μM de tBHQ durante 24 h, seguido por el tratamiento con MPP+ 25 μM durante 1 hora. NT (No tratadas), NA (Barras blancas), AA (barras asuradas) y OA (Barras negras). Cada barra representa la media D.S. de 6 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada con respecto a las células no tratadas (NT) y señaladas con: *($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$), además fueron consideradas las diferencias significativas entre los grupos tratados y los no tratados con tBHQ y señalados con: # ($P < 0.05$).



17

Figura 17. Supervivencia celular después del tratamiento con el tóxico MPP+ en astrocitos pre-tratados con tBHQ
 Los astrocitos primarios fueron pre-tratados con 25 μM tBHQ durante 24 horas y posteriormente se les administró MPP+ 25 μM durante 1 hora. El inserto en la figura representa astrocitos NA pre-tratados con 50 μM tBHQ durante 24 horas, seguidos de un tratamiento con MPP+ 25 μM durante 1 hora. NT (No tratados), NA (Barras blancas), AA (Barras asuradas) y OA (Barras Negras). La viabilidad celular fue determinada mediante la técnica de exclusión de azul tripano como se describió anteriormente. Cada barra representa la media D.S. de 6 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada con respecto a las células no tratadas (NT) y señaladas con: *(P<0.05), **(P<0.01),***(P<0.001), además fueron consideradas las diferencias significativas entre los grupos tratados y los no tratados con tBHQ y señalados con: # (P<0.05).

10. DISCUSIÓN.

No es casualidad que el cerebro sea un órgano sumamente susceptible al daño oxidante, considerando que este órgano depende totalmente de glucosa y requiere elevadas concentraciones de oxígeno, además de que está conformado por grandes cantidades de lípidos insaturados y posee bajos niveles de enzimas antioxidantes. Es por ello que la etiología de una gran cantidad de enfermedades neurológicas se han relacionado con el estrés oxidante (Baillet et al., 2010; Fernández-Checa et al., 2010).

En los últimos años ha surgido un renovado interés por estudiar a los astrocitos, ya que se han descrito nuevas características de su fisiología y función. Recientemente, se ha reportado que los astrocitos regulan la transmisión sináptica como parte de una sinapsis tripartita (Halassa et al., 2009), que mantienen la integridad de la barrera hematoencefálica (Sofroniew y Vinters, 2010), así como los niveles de colesterol en el cerebro (Chen et al., 2012), y la homeostasis del cobre (Scheiber and Dringen, 2012), además que producen antioxidantes que ayudan a proteger a las neuronas. Sin embargo, se sabe que estas células disminuyen su capacidad neuroprotectora durante el envejecimiento (Pertusa et al., 2007), lo cual ha evidenciado su importante participación en enfermedades neurodegenerativas (Bhat et al., 2012; Molofsky et al., 2012). Por ello, comprender su fisiología, la susceptibilidad que tienen a distintos agentes tóxicos en función de la edad, y su capacidad de orquestar una respuesta antioxidante, es esencial para comprender el desarrollo de dichas enfermedades.

En el presente estudio, comparamos los efectos de concentraciones equimolares de dos diferentes neurotoxinas (β -amilode y MPP+), que han sido utilizadas para mimetizar algunas características específicas observadas en algunas enfermedades neurodegenerativas en las cuales se ha observado que se incrementa la producción de radicales libres y el estrés oxidante. Para validar los experimentos, se utilizó un control positivo de daño oxidante a nivel celular empleando al H_2O_2 , por lo que fue incluido en los demás experimentos con el propósito de generar comparaciones con los otros agentes tóxicos. El uso de este importante control positivo de daño oxidante permitió considerar a nuestros experimentos como satisfactoriamente confiables y reproducibles.

Con respecto a los efectos del β -amilode, se ha reportado que durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer (AD), la disfunción neurológica es precedida por el desarrollo de depósitos fibrilares de este péptido (Arnold et al., 1998). Como se mencionó previamente, la inducción de astrocitos reactivos, o astrogliosis, es necesaria para proteger a las células en el CNS; no obstante, esta respuesta involucra la liberación de citocinas pro-inflamatorias, ROS, RNS, y factores del complemento, entre otros, y todos ellos en conjunto son capaces de promover el daño celular (Reale et al., 2012). Se ha observado en estudios

previos, en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*, que el β -amiloide tiene un efecto tóxico sobre las neuronas mientras se activa la astrogliosis (Malchiodi-Albedi et al., 2001; Rogers et al., 2002). Es de suma relevancia mencionar que algunos reportes destacan la capacidad que tienen los astrocitos para proteger a las neuronas contra los efectos tóxicos inducidos por el β -amiloide (Giulian et al., 1993; Wilson, 1997); mientras que otros autores mencionan que los astrocitos incrementan la toxicidad del β -amiloide (Hu et al., 1998; Johnstone et al., 1999; Malchiodi-Albedi et al., 2001). Nuestros resultados sugieren que la disminución en la viabilidad celular durante los tratamientos a tiempos cortos (5 h) y largos (72 h) de exposición al β -amiloide se encuentran relacionados con un mecanismo que involucra la generación de un estado de estrés oxidante, lo cual fue confirmado por un incremento en el daño oxidante a lípidos y proteínas. No obstante, es importante tomar en cuenta otros factores para determinar y comprender la toxicidad del β -amiloide. En primer lugar, la incapacidad celular en el manejo de los niveles de calcio y la disminución en las concentraciones de GSH, son probablemente los primeros efectos que se han reportado como asociados al daño en astrocitos en un cultivo mixto de astrocitos/neuronas (Abramov et al., 2005). La disfunción mitocondrial y el estrés oxidante también se han implicado como parte del efecto tóxico provocado por el β -amiloide (Bisaglia et al., 2004), lo cual concuerda con los resultados de este estudio. Por otra parte, estos dos eventos podrían estar relacionados con la activación de la NADPH oxidasa, una enzima pro-oxidante, la cual ha sido propuesta por Abramov et al. 2004 como la principal generadora del cambio en el estado redox. Aunque se ha reportado que el β -amiloide tiene efectos directos sobre los receptores NMDA y la excitotoxicidad (Peña et al., 2006), es poco probable que este mecanismo pudiera ser responsable de la toxicidad del péptido sobre los astrocitos en nuestro estudio, ya que no se ha reportado la presencia de receptores NMDA funcionales en cultivos celulares de astrocitos (Matyash y Kettenmann, 2010).

Así mismo, nuestros resultados muestran que los astrocitos expuestos al β -amiloide (fragmento 25-35) presentaron una ligera resistencia a la toxina, siendo el modelo menos agresivo de entre las dos toxinas probadas para inducir daño oxidante en este tipo celular. Este resultado podría formar parte de un efecto bifásico del β -amiloide, que ya se ha reportado para los astrocitos en cultivo,

puesto que se encontró una resistencia a tiempos cortos de exposición frente a diferentes fragmentos de la toxina (Pentreath y Mead, 2004). Aunque en nuestro estudio, los astrocitos mostraron moderada resistencia, en su mayoría sufrieron diferentes alteraciones, haciéndolos vulnerables a la toxina por los mecanismos ya descritos anteriormente. Una consideración adicional se debe de establecer de acuerdo a los resultados obtenidos por Paradisi y colaboradores (2004), quienes encontraron que los astrocitos no expuestos al β -amiloide podrían estar protegiendo a las neuronas en cultivo, pero cuando son expuestos al β -amiloide, los astrocitos no sólo son vulnerables a la toxina, sino que también contribuyen al daño neuronal.

Todo lo anterior apunta a que los astrocitos desarrollan una resistencia asociada al tratamiento con β -amiloide, para que después puedan proteger a otros tipos celulares. No obstante, aún no se sabe con certeza cuál podría ser el mecanismo por el cual logren resistir a la toxicidad inducida por el β -amiloide u otras toxinas. Al parecer, este mecanismo podría estar relacionado con la activación de enzimas antioxidantes (Jeong et al., 2005; Valles et al., 2010). Por lo tanto, la capacidad antioxidante podría ser la característica fisiológica más importante que tienen los astrocitos para contrarrestar la toxicidad del β -amiloide.

Para analizar los resultados obtenidos con el tóxico MPP+, hay que considerar algunas de sus características. Mientras que las neuronas dopaminérgicas son vulnerables a las acciones tóxicas del MPTP debido a su capacidad de retener y acumular al MPP+, sólo algunos reportes sugieren que el MPP+ puede ejercer directamente daños sobre los cultivos primarios de astrocitos de rata. Por ejemplo, se ha reportado que el MPP+ puede causar fallas en el metabolismo energético de los astrocitos por interrupción de la función mitocondrial, además de alterar sus niveles de glutamato (Di Monte et al., 1999). Además, se ha sugerido que la toxicidad del MPP+ en cultivos de astrocitos depende del estrés oxidativo y nitrosativo (Tsai and Lee, 1998). Esta evidencia fue precedida por estudios comparativos en donde se demostró una capacidad diferencial para acumular MPP+ y expresar la toxicidad entre ratas y ratones, sugiriendo que los cultivos de astrocitos de la primera especie acumulan menos MPP+ mientras expresan mayor toxicidad a altas

concentraciones de este tóxico (Tsai and Lee, 1994). Esto es relevante porque, en contraste con los astrocitos de ratón que acumulan más MPP+ y son más vulnerables (Wu et al., 1992), parecería que la toxina podría estar actuando por diferentes mecanismos en los astrocitos de ratas. En conjunto, esta evidencia demuestra que los astrocitos podrían ser vulnerables al MPP+ debido a su limitada capacidad para contrarrestar las acciones tóxicas de este compuesto una vez que está disponible en el medio. La relevancia de este estudio es que proporciona evidencia, por primera vez, sobre la vulnerabilidad de los astrocitos obtenidos de ratas de diferentes edades. Nuestros resultados obtenidos en los astrocitos de recién nacidos (NA) concuerdan con los resultados obtenidos por otros grupos, donde los efectos tóxicos se observan en los mismos rangos de concentraciones (10-100mM) (Chen et al., 2008; Chuang y Chen, 2004; Hu et al., 2005). De manera similar al efecto observado con el β -amiloide, el MPP+ fue capaz de inducir daño oxidante a lípidos y proteínas, confirmando que los patrones ejercidos por estos dos agentes tóxicos están relacionados con mecanismos pro-oxidantes. Es de destacar que la única diferencia significativa encontrada entre recién nacidos y adultos fue la disfunción mitocondrial, la cual se pudo observar en el tratamiento a las 5 h, ya que a tiempos largos (72 h) la mayoría de las células de ambos cultivos murieron. Este resultado es relevante ya que el MPP+ es producido en los astrocitos y secretado al espacio extracelular, donde es selectivamente tomado por las neuronas dopaminérgicas, causando daño mitocondrial. Sin embargo, aquí hemos demostrado que, además de los daños reportados y que se están llevando a cabo en las neuronas debido a la transformación del MPTP en los astrocitos, también se observa que los mismos astrocitos presentan una susceptibilidad a ser dañadas por el MPP+.

Después de encontrar una disfunción mitocondrial significativa en respuesta al tratamiento con MPP+, decidimos realizar un estudio dosis-respuesta a bajas concentraciones y tiempos cortos de exposición, debido a que durante los tratamientos a tiempos largos de exposición, el daño celular fue severo, lo que no permitió observar diferencias significativas entre los grupos de edad analizados, incluyendo, a partir de este momento, astrocitos provenientes de ratas seniles (OA). Nuestros datos muestran que las diferencias entre las grupos de edades fueron más evidentes después del tratamiento durante 1 h a

25 y 50 μ M; en este punto, fue notable la generación de un estado oxidante inducido con el MPP+. Así, la viabilidad y funcionalidad de los astrocitos disminuyó de manera significativa en relación directamente proporcional a la edad del animal del cual provinieron los astrocitos, mientras que el daño oxidante se incrementó en función de la edad. Estos resultados se podrían explicar de acuerdo a la teoría del envejecimiento por radicales libres propuesta por Harman (1956), la cual postula que la disminución en las funciones bioquímicas y fisiológicas asociadas al envejecimiento se deben al incremento del daño oxidante, el cual es acumulado a lo largo de la vida de un individuo. Sin embargo, sería interesante investigar si el mecanismo observado en astrocitos es el mismo en neuronas, especialmente en consideración de la mayor susceptibilidad que se encontró en AA y OA.

También hay que considerar los datos de Chuang y Chen (2004), quienes reportaron que la línea celular de astrocitoma U373MG responde al estrés oxidante mediante la eliminación de las ROS a través del sistema antioxidante del GSH, pero este sólo resulta efectivo cuando se administran concentraciones bajas de MPP+. En otros estudios (Jia et al., 2009) se menciona que los astrocitos de origen humano son capaces de atenuar el daño oxidante producido por esta toxina cuando son tratados con el nutraceutico cruciferous 3H-1,2-ditiol-3-tiona, el cual es capaz de incrementar la expresión de enzimas antioxidantes de fase 2 y de las que participan en el reciclamiento del GSH. Por otra parte, es probable que los astrocitos de rata tuvieran la capacidad de responder al estrés oxidante mediante mecanismos que aún deben ser determinados. Al mismo tiempo, debe hacerse notar que los astrocitos de rata y humano son diferentes, y por ello, podrían realizarse diferentes estudios comparativos en donde queden de manifiesto las propiedades fisiológicas de estas células y su capacidad de respuesta ante el estrés oxidante. Por lo tanto, hay que tener cuidado con la interpretación y extrapolación de los resultados obtenidos con astrocitos de estas dos especies. Esto es particularmente relevante para las funciones generales y mitocondriales, las cuales se sabe que son cruciales para desarrollar una resistencia ante la toxicidad del MPP+ a través de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la adecuada recaptura del glutamato (Di Monte et al., 1999) a través de los receptores metabotrópicos II y III (Yao et al., 2005).

Otra contribución original de nuestro trabajo fue la demostración del efecto tóxico ejercido por el MPP+ en astrocitos de rata, ya que existe una gran cantidad de estudios sobre las diferentes condiciones tóxicas evocadas por el MPTP y el MPP+ ya probadas en astrocitos de ratón (Di Monte et al., 1992; Mallajosyula et al., 2008), pero muy pocos en realidad en astrocitos de rata (Tsai and Lee, 1994). Por lo tanto, todavía es necesario realizar investigaciones en astrocitos de ratas utilizando otros agentes para comprender de mejor manera su capacidad de respuesta y sus propiedades fisiológicas.

En resumen, en cuanto a los dos agentes neurotóxicos estudiados, el hecho de que ambos actúen a través de mecanismos diferentes sirvió para establecer la diferente sensibilidad que presentan los astrocitos A cada modelo, ya que el β -amiloide produce auto agregación, inflamación y excitotoxicidad, mientras que el principal efecto del MPP+ es una acción directa sobre la función mitocondrial. Aún cuando ambos mecanismos convergen en la generación de estrés oxidante, en la primera parte de este trabajo se demostró una mayor sensibilidad al MPP+ en los astrocitos adultos y seniles (AA y OA), así como un incremento en la lipoperoxidación y en la oxidación de proteínas. Esta diferencia en la susceptibilidad asociada a la edad nos lleva a preguntarnos si durante el envejecimiento se presenta un incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno, o bien si la susceptibilidad diferencial se asocia a una disminución en la respuesta celular antioxidante.

Se ha reportado, en estudios realizados en cultivos de astrocitos de ratones SAMP8, que existe un incremento en la producción de ROS, en la lipoperoxidación y en la oxidación de proteínas con respecto a los cultivos de astrocitos de SAMR1 (García-Matas et al., 2008). En cuanto a la disminución de las defensas antioxidantes, se ha reportado una disminución en la expresión y actividad de la enzima γ -glutamil-cisteina sintetasa (γ -GCS, una enzima que regula la síntesis de novo de GSH) en diferentes secciones del cerebro de ratas Fisher. Esta disminución fue acompañada por una caída en la concentración de GSH total (Liu, 2002). En un trabajo similar, se observó, en cerebro de ratas envejecidas, una disminución en los niveles de GSH y un incremento en el GSSG; además, se presentó una disminución en la γ -GCS y un incremento en la lipoperoxidación, y estos resultados fueron acompañados por un incremento en la actividad de enzimas que usan al GSH como sustrato,

como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión sulfhidril transferasa (GST) y la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) (Zhu et al., 2006). Estos resultados sugieren que en las células de animales viejos hay un deterioro en la respuesta antioxidante, la cual contribuye al proceso de envejecimiento celular. En contraparte, se ha reportado un incremento en la producción del radical superóxido, en la lipoperoxidación, en la oxidación de proteínas y en el contenido de hierro libre en cultivo de astrocitos seniles; no obstante, se observó que las defensas antioxidantes no variaron, o incluso se presentaron incrementadas, sin modificar el que los astrocitos seniles sean más vulnerables al daño oxidante que los astrocitos de neonatos (Papadopoulos et al. 1998; Gottfried et al. 2002; Klamt et al. 2002). Similares resultados se obtuvieron en un trabajo reciente en donde se analizaron cultivos celulares de astrocitos provenientes de individuos de diferentes edades: 1 día (neonatos), 12 meses (maduros), 25 meses (adultos) y 31 meses (senescentes). En dicho trabajo se observó que la capacidad antioxidante y el metabolismo del glutatión de los astrocitos se presentan sin alteraciones en maduros, adultos y senescentes, por lo que sugieren que el estrés oxidante presente en los cerebros envejecidos se debe a factores extrínsecos a los astrocitos (Liddell, et al., 2010).

En los últimos años, se ha reportado un mecanismo para incrementar la respuesta celular antioxidante; este mecanismo es inducido mediante la activación de una región del promotor de diferentes enzimas que participan en la respuesta celular antioxidante y que poseen esta secuencia consenso denominada elemento de respuesta antioxidante (ARE). Diferentes factores de transcripción pueden unirse a ARE, y entre los más importantes se encuentra el Nrf2 (Itoh et al., 1997; Motohashi y Yamamoto, 2004; Osburn et al., 2006). El grupo de investigación de Lee y cols. demostró en el 2003 que la activación de Nrf2 inducida por el antioxidante fenólico tBHQ es importante, ya que incrementa la expresión de enzimas antioxidantes como la GST, la γ -GCS, y la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1), lo que le confiere protección a cultivos primarios de astrocitos ante retos oxidantes inducidos con H_2O_2 , y con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Este dato ha sido confirmado por una gran cantidad de grupos de investigación (Li et al., 2005; FAO/WHO, Kraft et al., 2004; Yan et al., 2010).

El Nrf2 es una proteína que se localiza en el citoplasma y continuamente es degradada durante la homeostasis celular; no obstante, en respuesta a un desbalance en el estado redox celular, el Nrf2 es liberado de su proteína represora Keap-1 (Keap-1/Cul3/Rbx1), y posteriormente es translocado al núcleo. Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los reportes en que la translocación de Nrf2 se presenta en las 2 primeras horas posteriores al desbalance redox (Niture et al., 2010), aunque nuestros datos muestran diferentes tiempos de translocación en los distintos grupos de edades estudiados. Esto tiene sentido si se considera que el fenómeno de translocación de Nrf2 puede obedecer a un patrón multimodal. Sin embargo, nuestros resultados difieren de lo reportado en dos aspectos: En primer lugar, la translocación nuclear de Nrf2 se encuentra usualmente acompañada por una disminución citosólica de este factor, la cual no se observa en nuestro modelo, ya que nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de Nrf2 total en las células tratadas con tBHQ. En segundo lugar, se ha propuesto que después de ejercer su acción, el Nrf2 es translocado fuera del núcleo para ser degradado vía proteosoma (Niture et al., 2010), por lo que nuestros resultados concuerdan con el hecho de que Nrf2 sólo se une a su elemento ARE por un período corto de tiempo, aunque no es liberado del núcleo durante las primeras 24 horas. Estos resultados son de gran relevancia y podrían explicarse en parte debido a que la mayoría de los estudios realizados son en líneas celulares, y no en cultivos primarios. De esta manera, la transducción de señales en nuestro modelo podría evidenciar mecanismos diferentes a los reportados, y tal vez represente mejor lo que sucede en un modelo animal. Algunas posibles explicaciones, las cuales sería muy importante investigar más a fondo, están relacionadas a los procesos de degradación de Nrf2. Estos procesos tienen numerosos mecanismos de regulación, los cuales todavía se encuentran en debate. Se ha propuesto que algunos miembros de la sub-familia de Src A cinasa, como Fyn, Src, Yes y Fgr, regulan negativamente los niveles nucleares de Nrf2 mediante una fosforilación en la Tyr568. Esta modificación es necesaria para que el Nrf2 sea exportado al citosol para su posterior degradación (Lee et al., 2007). Sin embargo, se sabe que GSK3 β es una proteína sensible a los cambios en el estado redox que regula la translocación nuclear de las Src

cinastas, así que las modificaciones en el estado redox a través de tBHQ podrían estar interfiriendo con este proceso, llevando así a una acumulación de Nrf2 en el núcleo. Además, la Akt (cinasa que fosforila a GSK3 β , inactivándolo), también es activada por cambios en el estado redox (Luna-López et al., 2013; Niture et al., 2011), lo cual podría contribuir a la acumulación nuclear de Nrf2.

Como se ha mencionado, el principal proceso de degradación de Nrf2 es mediado por Keap-1/Cul3/Rbx1 en el citosol (Niture et al., 2009; Niture y Jaiswal 2009); sin embargo, es el mismo factor Nrf2 el que se ha propuesto como regulador de los niveles de expresión de Keap-1 (Lee et al., 2007) y de Cul3/Rbx1 (Kaspar y Jaiswal, 2010), por lo que es posible que este sistema también pudiera estar mal regulado tanto en el citosol como en el núcleo. Finalmente, incluso aunque hubiera un exceso de Nrf2 en el citosol, ya sea debido a la síntesis *de novo*, a la falla en el proceso de degradación, o ambas hipótesis, el Nrf2 podría ser incapaz de translocarse al núcleo porque PKC δ , la cual fosforila a Nrf2 en el residuo de Ser40, podría estar comprometida y no realizar esta función (Zhang y Hannink, 2003; Niture et al., 2009).

Otro punto importante a discutir es por qué Nrf2 no se encuentra unido a su secuencia de ADN (ARE) aún cuando se encuentra en grandes concentraciones en el núcleo. Para tratar de dilucidar lo anterior, existen al menos dos posibles explicaciones. Una está relacionada con un competidor de Nrf2, la proteína Bach1, la cual se sabe que se transloca al núcleo antes que Nrf2 y compite por el sitio de unión a ARE. Bach1 se une al elemento ARE, regulando de manera negativa la expresión de diferentes genes (Dhakshinamoorthy et al., 2005). La otra explicación tiene que ver con los nuevos hallazgos sobre los cambios epigenéticos en la cromatina, especialmente en la acetilación de los genes blanco de Nrf2; este proceso podría favorecer o impedir la unión de Nrf2 a su secuencia de ADN. Adicionalmente, recientes estudios han demostrado que niveles incrementados de las enzimas HDA reducen la capacidad de unión de Nrf2 al DNA (Wang et al., 2012).

Las alteraciones en las funciones antioxidantes de los astrocitos durante el envejecimiento pueden estar relacionadas con cambios sutiles en la homeostasis redox celular, por lo que en el presente trabajo demostramos que

al incubar a los astrocitos provenientes de animales de distintas edades con diferentes concentraciones de tBHQ, logramos incrementar la respuesta celular antioxidante a través de la activación del factor de transcripción Nrf2 y el incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes γ -GCS y GST, además de incrementar los niveles de GSH. De manera interesante, nuestros resultados muestran que el incremento en la respuesta antioxidante en los diferentes cultivos de astrocitos es inducida con diferentes concentraciones de tBHQ: 50 μ M para los cultivos de neonatos y 25 μ M para los cultivos de astrocitos provenientes de individuos adultos y seniles. El tratamiento con tBHQ además incrementó la supervivencia celular de los astrocitos ante retos letales con el MPP+. Más aún, demostramos que el tratamiento con concentraciones de tBHQ superiores a las antes mencionadas resulta ser tóxico, disminuyendo la viabilidad celular, lo cual sugiere una susceptibilidad diferencial ante el cambio en el estado redox celular generado por el tBHQ, el cual se ha reportado como una molécula que induce un incremento en las ROS a través de la mitocondria, mismas que pueden inducir un daño por estrés oxidante (Imhoff y Hansen, 2010). Consistente con nuestros resultados, se ha reportado que incubar células de la línea N27 con concentraciones superiores a 30 μ M de tBHQ durante 24 horas tiene efectos tóxicos al disminuir la viabilidad celular (Jakel et al., 2007). Además, se ha reportado que el tBHQ puede ser tóxico o carcinogénico al incrementar la formación de conjugados de GSH, generando especies reactivas de oxígeno, así como por incrementar la actividad del citocromo p450 1A1 (CYP1A1) (Gharavi et al., 2007).

La información recabada por nosotros y por lo reportado por otros grupos de trabajo sobre la capacidad del tBHQ para incrementar la respuesta antioxidante, nos sugiere que este mecanismo es dependiente de un umbral de respuesta del factor de transcripción Nrf2, y que también es dependiente de la capacidad de los mecanismos de reparación del daño oxidante que en ese momento posea el tipo celular en estudio. El umbral de respuesta antioxidante es consistente con un proceso fisiológico y evolutivo que se presenta en los seres vivos, la hormesis, el cual ha sido definido como un mecanismo que describe procesos de pre-acondicionamiento y respuestas adaptativas a exposiciones de bajas concentraciones de una molécula o condición ambiental que generen un desbalance en la homeostasis celular, la respuesta celular

involucra un incremento en los sistemas de defensa celular que le proporcionan al individuo la capacidad para contrarrestar procesos de estrés de mayor intensidad que los que generaron la respuesta (Calabrese, 2008; Mattson, 2008; Mathers et al., 2004, López-Diazguerrero et al., 2013). Un reporte previo de nuestro grupo de trabajo muestra que el pre-acondicionamiento con una dosis sub-letal de H_2O_2 incrementa la respuesta celular antioxidante activando al Nrf2 y aumentando la expresión de las enzimas GST y γ -GCS, lo cual le confiere protección a la célula en la respuesta celular ante retos oxidantes posteriores con dosis letales de H_2O_2 ; este mecanismo de protección celular se ha correlacionado con el incremento en la expresión de proteínas que participan en la supervivencia celular como lo es la proteína Bcl-2 (Luna-López et al., 2010).

El modelo de pre-acondicionamiento con tBHQ que desarrollamos en cultivos primarios de astrocitos provenientes de diferentes edades, nos sugiere que el incremento en la respuesta antioxidante para proteger contra el daño oxidante inducido con MPP+ es dependiente del estado redox celular, evaluado por el cociente GSH/GSSG. Nuestros resultados sobre el balance redox en los cultivos de adultos y seniles (AA y OA) muestran un incremento en el cociente GSH/GSSG, lo que sugiere un pre-acondicionamiento exitoso con el tBHQ, el cual se ve reflejado en el incremento en la viabilidad celular cuando se reta a los astrocitos con el tóxico MPP+. Sin embargo, es importante mencionar que los cultivos de astrocitos provenientes de neonatos (NA) no presentaron diferencias en el cociente GSH/GSSG con respecto al control, lo cual sugiere que la pre-incubación con tBHQ no fue lo suficiente para incrementar la respuesta antioxidante y que la respuesta celular antioxidante que se observa posterior al reto oxidante con MPP+ es prácticamente la que poseen las células normales, y que es la característica del vigor que se presenta en los individuos neonatos. En contraparte, el pre-acondicionamiento con 50 μ M de tBHQ sí fue capaz de inducir un incremento en los niveles de GSH/GSSG, lo que resulta favorable para contrarrestar el reto oxidante del tóxico MPP+, lo cual se corroboró por el incremento en la viabilidad celular. De esta manera demostramos que los astrocitos son capaces de incrementar la respuesta antioxidante siempre y cuando se traten dentro de su umbral de respuesta particular.

Aún quedan muchas cuestiones por resolver, principalmente aquellas que tienen que ver con el mecanismo transduccional que se presenta durante la activación del Nrf2. Por ello, es necesario conocer que condición durante el estado redox celular es fundamental para incrementar la respuesta antioxidante y encontrar los vínculos con algunos otros mecanismos involucrados en la reparación celular. Sin duda alguna debe de existir una relación con aquellas moléculas que tienen la capacidad para sensar el daño oxidante en las biomoléculas, principalmente aquellas que están involucradas en el proceso de muerte celular, como lo son todas aquellas que participan en la vía de muerte celular vía p53. Otro mecanismo que resulta interesante evaluar es el relacionado con los mecanismos de proteostasis celular asociados al proceso de envejecimiento, ya que en este trabajo mostramos la susceptibilidad que tienen los astrocitos provenientes de individuos adultos y seniles a incrementar el daño oxidante a proteínas, lo que nos sugiere un desbalance en los procesos de reparación y síntesis de proteínas.

Finalmente, los resultados de nuestro trabajo sugieren que los precondicionamientos con alguna molécula capaz de modificar el estado redox celular de una manera subletal pueden ser el principio del desarrollo de terapias para contrarrestar los efectos de las patologías relacionadas a la edad, principalmente aquellas que están involucradas con el estrés oxidante, entre las que destacan la EP, la EA y el Huntington.

11. CONCLUSIONES.

- El tóxico MPP+ generó un mayor daño oxidante que el β -amiloide, en los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas de diferentes edades.
- La concentración y el tiempo óptimos para determinar la susceptibilidad diferencial al daño oxidante en cultivos primarios de astrocitos de diferentes edades inducido por el tóxico MPP+ en nuestro modelo fue de 25 μ M durante 1 hora.
- El compuesto tBHQ indujo una respuesta antioxidante vía Nrf2 en los cultivos de astrocitos primarios, tanto de adultos como de animales seniles, de manera muy similar a la observada en jóvenes.
- Los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas adultas y seniles incrementaron la respuesta antioxidante vía Nrf2 y contrarrestaron el daño oxidante inducido con el tóxico MPP+, a diferencia de lo observado en astrocitos neonatos.
- La respuesta hormética antioxidante inducida por el pre-tratamiento con tBHQ en los cultivos primarios de astrocitos de rata dependió de la concentración de la molécula inductora, y fue inversamente proporcional a la edad.
- La respuesta al pre-tratamiento con tBHQ manifestó un factor relacionado a la susceptibilidad frente daño oxidante dependiente de la edad de los organismos de donde provinieron los astrocitos.
- La activación de Nrf2 dependió de la concentración del inductor empleado, así como de la susceptibilidad de los astrocitos al daño, aunque la permanencia del factor Nrf2 en el núcleo por tiempos prolongados sugiere que existen otros mecanismos de regulación durante la respuesta antioxidante vía Nrf2.

12. PERSPECTIVAS.

- Determinar el mecanismo de transducción de señales que participan en la respuesta hormética antioxidante vía Nrf2.
- Sobre-expresar Nrf2 y determinar si este evento por sí solo incrementa la respuesta celular antioxidante en los astrocitos de los animales de las diferentes edades.
- Determinar si existen mecanismos epigenéticos que participen en la regulación de la respuesta celular antioxidante mediada por Nrf2.
- Establecer un modelo de inducción de Nrf2 en un modelo *in vivo* empleando animales de diferentes edades.
- Determinar si en el modelo *in vivo*, los animales adultos y seniles son capaces de contrarrestar el daño oxidante producido por diferentes tóxicos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas, como EP y EA.
- Determinar si en el modelo *in vivo*, los animales adultos y seniles son capaces de contrarrestar el daño oxidante acumulado durante el envejecimiento, y si este modelo puede incrementar la calidad de vida y la longevidad.

13.BIBLIOGRAFÍA

- Abramov AY, Duchen MR.Philos. 2005. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;2309-14.
- Adams JD Jr, Wang B. 1994. Vitamin E uptake into the brain and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14; 362-3.
- Adibhatla RM, Hatcher JF. 2010. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antiox. Redox Signal.* 12:125–169.
- Anantharam V, Kaul S, Song C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. 2007. Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells..*Neurotoxicology.* 28;988-97.
- Arnold SE, Smutzer GS, Trojanowski JQ, Moberg PJ.1998. Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci.* 30;762-75
- Aron L, Klein P, Pham TT, Kramer ER, Wurst W, Klein R. 2010. Pro-survival role for Parkinson's associated gene DJ-1 revealed in trophically impaired dopaminergic neurons. *PLoS Biol.* 6;8
- Baillet A, Chanteperdrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. 2010. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease.*Neurochem Res.* 35;1530-7
- Barzilai A, Melamed E. 2003. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 9;126-32
- Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L, Danilenko M, Dubi N, Linnewiel K, Zick A, Sharoni Y, Levy J. 2005. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Mol Cancer Ther.* 4; 177-86.

- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre J. 2002. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 24;308-18
- Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, Crossman AR, Bioulac B, Brotchie JM, Gross CE. 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 21(17):6853-61.
- Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L, Danilenko M, Dubi N, Linnewiel K, Zick A, Sharoni Y, Levy J. 2005. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Mol. Cancer Ther*. 4:177–186.
- Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C. 2012. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *CPLoS One*. 7:45
- Bisaglia M, Venezia V, Biglieri M, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G. 2004. alpha-Glycerolphosphorylethanolamine rescues astrocytes from mitochondrial impairment and oxidative stress induced by amyloid beta-peptides. *Neurochem Int*. 44;161-70.
- Blesa J, Juri C, Collantes M, Peñuelas I, Prieto E, Iglesias E, Martí-Clement J, Arbizu J, Zubieta JL, Rodríguez-Oroz MC, García-García D, Richter JA, Cavada C, Obeso JA. 2010. Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non-human primates. An (18) F-DOPA and (11)C-DTBZ PET study. *Neurobiol Dis*.38;456-63
- von Bohlen y Halbach O. 2005. Modeling neurodegenerative diseases in vivo review. *Neurodegener Dis*. 2; 313-20
- Bonifati V.2005. Genetics of Parkinson's disease. *Minerva Med*. 96;175-86
- Bors W, Saran M. 1987.Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic. Res. Commun*. 2:289–294.

- Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2;484-94
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 318; 121-34
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72; 248–254
- Calabrese EJ. 2008. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes–Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7:8–20.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ. 2007. Biological stress response terminology. *Toxicol. Appl. Pharm.* 222:122-128.
- Calabrese EJ, Baldwin LA. 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature*. 421:691-692.
- Calabrese V, Cornelius C, Cuzzocrea S, Iavicoli I, Rizzarelli E, Calabrese EJ. 2011. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol. Aspects Med.* 32:279-304.
- Calabrese V, Cornelius C, Stella AM, Calabrese EJ. 2010. Cellular stress responses, mitostress and carnitine insufficiencies as critical determinants in aging and neurodegenerative disorders: role of hormesis and vitagenes. *Neurochem. Res.* 35:1880-1915.

- Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. 1990. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic. Biol. Med.* 9:441–449.
- Chase TN, Juncos JL, Fabbrini G, Mouradian MM. 1998. Motor response complications in advanced Parkinson's disease. *Funct Neurol.* 3;429-36
- Chen H, Wang S, Ding JH, Hu G. 2008. Edaravone protects against MPP⁺-induced cytotoxicity in rat primary cultured astrocytes via inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *J. Neurochem.* 106:2345-2352.
- Chen J, Zhang X, Kusumo H, Costa LG, Guizzetti M. 2012. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831; 263–275.
- Chen Y, Swanson RA. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23; 137-49
- Choi YG, Park JH, Lim S. 2009. Acupuncture inhibits ferric iron deposition and ferritin-heavy chain reduction in an MPTP-induced parkinsonism model. *Neurosci Lett.* 30;92-6
- Chuang JI, Chen TH. 2004. Effect of melatonin on temporal changes of reactive oxygen species and glutathione after MPP (+) treatment in human astrocytoma U373MG cells. *J. Pineal Res.* 36;117–125.
- Croce N, Dinallo V, Ricci V, Federici G, Caltagirone C, Bernardini S, Angelucci F. 2011. Neuroprotective effect of neuropeptide Y against β -amyloid 25-35 toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with increased neurotrophin production. *Neurodegener Dis* 8; 300–309.

- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 11; 889-909.
- Darlington CL. 2005. Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 6:700–703.
- Dawson VL, Dawson TM. 1996. Free radicals and neuronal cell death. *Cell death and differentiation* 3: 71-78.
- Deneke SM, Fanburg BL. 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*. 163-73
- 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* 29;280
- Di Monte DA, Tokar I, Langston JW. 1999. Impaired glutamate clearance as a consequence of energy failure caused by MPP (+) in astrocytic cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158; 296–302.
- Di Monte DA, Wu EY, Langston JW. 1992. Role of astrocytes in MPTP metabolism and toxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 11; 219–228.
- Dickinson DA, Iles KE, Zhang HQ, Blank V, Forman HJ. 2003. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate–cysteine ligase gene expression. *FASEB J.* 17:473–476.
- Dillin A, Cohen E. 2011. Ageing and protein aggregation-mediated disorders: from invertebrates to mammals. *Phil Trans R Soc B.* 366:94-98.
- Ding F, Luan L, Ai Y, Walton A, Gerhardt GA, Gash DM, Grondin R, Zhang Z. 2008. Development of a stable, early stage unilateral model of

- Parkinson's disease in middle-aged rhesus monkeys. *Exp Neurol.* 212:431-9.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 99:11908–11913.
 - DiSilvestro RA, Joseph E, Zhao S, Bomser J. 2012. Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people. *Nutr. J.* 11:79.
 - Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62; 649–671.
 - Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 405:903–904.
 - Eftekharzadeh B, Maghsoudi N, Khodaghali F. 2010. Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2N neurons. *Biochimie.* 92:245–253.
 - Erlank H, Elmann A, Kohen R, Kanner J. 2011. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radic. Biol. Med.* 51:2319-2327.
 - FAO/WHO. 1999. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the Joint Expert Committee on Food Additives., World Health Organization Technical Report Series, vol. 884, no. i-viii, pp. 1-96,
 - Fernández-Checa JC, Fernández A, Morales A, Marí M, García-Ruiz C, Colell A. 2010. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 9:439–454.

- Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paparelli A, Südhof TC. 2005. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 3413-8
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. 1993. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol.* 60;600-8.
- Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348:1365–1375.
- Fukae J, Mizuno Y, Hattori N. 2007. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion.* 7; 58-62.
- García-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R. 2008. Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell.* 7:630-640.
- Gharavi N, Haggarty S, El-Kadi AO. 2007. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr. Drug Metab.* 8:1-7.
- Giulian D, Vaca K, Corpuz M. 1993. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* 13;29–37.

- Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2008. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 23;283
- Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D, Goncalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuck ST, Souza DO. 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech. Ageing Dev.* 123:1333–1340.
- Grondin R, Zhang Z, Ai Y, Ding F, Walton AA, Surgener SP, Gerhardt GA, Gash DM. 2008. Intraputamenal infusion of exogenous neurturin protein restores motor and dopaminergic function in the globus pallidus of MPTP-lesioned rhesus monkeys. *Cell Transplant.* 17;373-81
- Hadjiconstantinou M, Tjioe S, Alho H, Miller C, Neff NH. 1987. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) accelerates the accumulation of lipofuscin in mouse adrenal gland. *Neurosci Lett.* 16;83-6
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2009. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology* 57; 343–346.
- Haleagrahara N, Ponnusamy K. 2010. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci.* 35; 41-7.
- Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59:1609-1623.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1997. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 69:1330-1
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40;140-55

- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J.Gerontol.* 11:298-300.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:51–88.
- Hazell AS, Itzhak Y, Liu H, Norenberg MD. 1997. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 6; 2216–2219.
- He X, Ma Q. 2009. Nrf2 cysteine residues are critical for oxidant/electrophile-sensing, Keap1-dependent ubiquitination-proteasomal degradation, and transcription activation. *Mol.Pharmacol.* 76:1265–1278.
- Hoffmann GR. 2009. A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response.*7:1-51.
- Hsieh TC, Lu X, WangZ, Wu JM. 2006. Induction of quinonereductase NQO1 by resveratrol in human K562 cells involves the antioxidant response element ARE and is accompanied by nuclear translocation of transcription factor Nrf2. *Med. Chem.* 2:275–285.
- Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van-Eldik LJ. 1998. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res.* 2;195–206.
- Hu LF, Wang S, Shi XR, Yao HH, Sun YH, Ding JH, Liu SY, Hu G. 2005. ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP+ on SH-SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *J. Neurochem.* 94; 1570–1579.
- Huang WS, Lee MS, Lin JC, Chen CY, Yang YW, Lin SZ, Wey SP. 2004. Usefulness of brain 99mTc-TRODAT-1 SPET for the evaluation of Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 31;155-61

- Imhoff BR, Hansen JM. 2010. Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. *Cell Biol.Toxicol.* 26:541-551.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S.1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem.Biophys. Res. Comm.* 236:313–322.
- Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, Johnson JA. 2007. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 1144:192-201.
- Jason LA, Timpo P, Porter N, Herrington J, Brown M, Torres-Harding S, Friedberg F. 2009. Activity Logs as a Measure of Daily Activity Among Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *J Ment Health.* 18; 6.
- Jeong JC, Yoon CH, Lee WH, Park KK, Chang YC, Choi YH, Kim CH. 2005.Effects of *Bambusae concretio Salicea* (Chunchukhwang) on amyloid beta-induced cell toxicity and antioxidative enzymes in cultured rat neuronal astrocytes. *J. Ethnopharmacol.* 98; 259–266.
- Jia Z, Zhu H, Li Y, Misra HP. 2009. Cruciferous nutraceutical 3H-1,2-dithiole-3-thione protects human primary astrocytes against neurocytotoxicity elicited by MPTP, MPP(+), 6-OHDA, HNE and acrolein. *Neurochem. Res.* 34; 1924–1934.
- JohnstoneM, Gearing AJ,Miller KM. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J. Neuroimmunol.* 93; 182–193
- Johnson DA, Andrews GK, Xu W, Johnson JA. 2002. Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. *J Neurochem.* 81; 1233-41.
- Kahlert S, Reiser G. 2004. Glial perspectives of metabolic states during cerebral hypoxia--calcium regulation and metabolic energy. *Cell Calcium.* 36;295-302

- Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* 42:64–69.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25:317–364.
- Kanner J, Mendel H, Budowski, P. 1977. Pro-oxidant and antioxidant effects of ascorbic-acid and metal-salts in a beta-carotene–linoleate model system. *J. Food Sci.* 42:60–64.
- Kaspar JW, Jaiswal AK. 2010. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J Biol Chem.* 1;153-62.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:89 116.
- Kidd PM. 2000. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev.* 5;502-29
- Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 1;302-13.
- Klamt F, Gottfried C, Tramontina F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML, Fonseca Moreira JC, Dias RD, Moriguchi E, Wofchuck S, Souza DO. 2002. Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport.* 13:1515–1518.
- Kliem MA, Pare JF, Khan ZU, Wichmann T, Smith Y. 2010. Ultrastructural localization and function of dopamine D1-like receptors in

the substantia nigra pars reticulata and the internal segment of the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Eur J Neurosci.* 31; 836-51

- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell Biol.* 24:7130–7139.
- Kraft AD, Johnson DA, Johnson JA. 2004. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J. Neuroscience.* 24:1101–1112.
- Kuhnau J. 1976. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24:117–191.
- Kurosaki R, Muramatsu Y, Michimata M, Matsubara M, Kato H, Imai Y, Itoyama Y, Araki T. 2002. Role of nitric oxide synthase against MPTP neurotoxicity in mice. *Neurol Res.* 24(7):655-62.
- Kuwajima M, Dehoff MH, Furuichi T, Worley PF, Hall RA, Smith Y. 2007. Localization and expression of group I metabotropic glutamate receptors in the mouse striatum, globus pallidus, and subthalamic nucleus: regulatory effects of MPTP treatment and constitutive Homer deletion. *J Neurosci.* 27(23):6249-60.
- Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. 2006. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem.* 281(44):33761-72.

- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 48(2):196-206.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219(4587):979-80.
- Lapidot T, Granit R, Kanner J. 2005. Lipid peroxidation by "free" iron ions and myoglobin as affected by dietary antioxidants in simulated gastric fluids. *J. Agric. Food Chem.* 53:3383–3390.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J. 2002a. Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J. Agric. Food Chem.* 50:3156–3160.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J. 2002b. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 50:7220–7225.
- Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.* 58:262–270.
- Lauterburg BH, Smith CV, Hughes H, Mitchell JR. 1984. Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J Clin Invest.* 73(1):124-33.
- Leblois A, Meissner W, Bioulac B, Gross CE, Hansel D, Boraud T. 2007. Late emergence of synchronized oscillatory activity in the pallidum during progressive Parkinsonism. *Eur J Neurosci.* 26(6):1701-13.

- 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.* 278:12029– 12038.
- Lee JM, Moehlenkamp JD, Hanson JM, Johnson JA. 2001. Nrf2-dependent activation of the antioxidant responsive element by tert-butylhydroquinone is independent of oxidative stress in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:286–292.
- Lee OH, Jain AK, Papusha V, Jaiswal AK. 2007. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem.* 282(50):36412-20.
- Lee BD, Shin JH, VanKampen J, Petrucelli L, West AB, Ko HS, Lee YI, Maguire-Zeiss KA, Bowers WJ, Federoff HJ, Dawson VL, Dawson TM. 2010. Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease. *Nat Med.* 16(9):998-1000.
- Li J, Johnson D, Calkins M, Wright L, Svendsen C, Johnson J. 2005. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicol. Sci.* 8:313–328.
- Li W, Kong AN. 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol.Carcinog.* 48:91–104.
- Liddell JR, Robinson SR, Dringen R, Bishop GM. 2010. Astrocytes retain their antioxidant capacity into advanced old age. *Glia.* 58:1500-1509.
- Lim SY, Fox SH, Lang AE. 2009. Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 66(2):167-72.

- Liu RM. 2002. Down-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging. *J. Neurosci. Res.* 68:344–351.
- Long LH, Clement MV, Halliwell B. 2000. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechingallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:50–53.
- López-Diazguerrero NE, González Puertos VY, Hernández-Bautista RJ, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Königsberg Fainstein M. 2013. Hormesis: What doesn't kill you makes you stronger. *Gac Med Mex.* 149 (4):438-47.
- Luna-López A, González-Puertos VY, Romero-Ontiveros J, Königsberg M. 2013. A noncanonical NF- κ B pathway through the p50 subunit regulates Bcl-2 overexpression during an oxidative conditioning hormesis response. *Free Radic. Biol. Med.* 63:41-50.
- Luna-López A, Triana-Martínez F, López-Diazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A, Gómez-Quiroz LE, Königsberg M. 2010. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 49:1192-1204.
- Malagelada C, Ryu EJ, Biswas SC, Jackson-Lewis V, Greene LA. 2006. RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *J Neurosci.* 26(39):9996-10005.
- Malchiodi-Albedi F, Domenici MR, Paradisi S, Bernardo A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. 2001. Astrocytes contribute to neuronal impairment in

beta A toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons. *Glia*. 34(1):68-72.

- Mallajosyula JK, Kaur D, Chinta SJ, Rajagopalan S, Rane A, Nicholls DG, Di Monte DA, Macarthur H, Andersen JK. 2008. MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS One*. 3(2):e1616.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:230S–242S.
- Mancuso M, Coppedè F, Murri L, Siciliano G. 2007. Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease: myth or reality? *Antioxid Redox Signal*. 9(10):1631-46.
- Martin JB, Gusella JF. 1986. Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N Engl J Med*. 315(20):1267-76.
- Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. 2004. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem. Soc. Symp.* 71:157-176.
- Mattson MP. 2008. Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.* 7;1-7.
- Matyash V, Kettenmann H. 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.* 63(1-2):2-10.
- Miyako K, Irie T, Muta T, Umeda S, Kai Y, Fujiwara T, Takeshige K, Kang D. 1999. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) selectively inhibits the replication of mitochondrial DNA. *Eur J Biochem.* 259(1-2):412-8.

- Mohammad AH, Butterfield DA. 2005. Protection against amyloid betapeptide (1-42)-induced loss of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by tricyclodecan-9-xanthogenate (D609) and ferulic acid ethyl ester: implications for Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*1741:140-148.
- Molinuevo JL, Valdeoriola F, Rumià J, Nobbe FA, Martínez R, Ferrer E, Tolosa E. 1999. Contribution of neurophysiological guidance to stereotactic posteroventral pallidotomy for Parkinson's disease. *Acta Neurochir (Wien)*. 141(11):1195-201.
- Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH. 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26(9):891-907.
- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic. Biol. Medic.* 39:1291-1304.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63.
- Motohashi H, Yamamoto M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trend. Mol. Med.* 10:549–557.
- Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, Ferreira M, Przedborski S. 1994. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Exp Neurol.* 126(2):195-204.
- Nakaso K, Ito S, Nakashima K. 2007. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett.* 432(2):146-50.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36(26):2503-8.

- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. 1987. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci.* 40(8):721-9.
- Nicklas WJ, Saporito M, Basma A, Geller HM, Heikkila RE. 1992. Mitochondrial mechanisms of neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.*648:28-36.
- Niture SK, Jaiswal AK. 2009. Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem.* 284(20):13856-68.
- Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 122(Pt 24):4452-64.
- Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):37-42.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS. 2004. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol.* 3(8):496-503.
- Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V.2006. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch. Biochem. Biophys.* 454:7–15.
- Papadopoulos MC, Koumenis IL, Yuan TY, Giffard RG.1998. Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience.* 82:915–925.
- Paradisi S, Sacchetti B, Balduzzi M, Gaudi S, Malchiodi-Albedi F. 2004. Astrocyte modulation of in vitro beta-amyloid neurotoxicity. *Glia.* 46:252-60.
- Pentreath VW, Mead C. 2004. Responses of Cultured Astrocytes, C6 Glioma and 1321NI Astrocytoma Cells to Amyloid beta-Peptide Fragments. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 2; 45-63.

- Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. 2006. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol.* 4:149-63.
- Pérez-Cruz C, Nolte MW, Van Gaalen MM. 2011. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 31:3926-3934.
- Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R. 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem.* 101; 794-805.
- Petit-Paitel A, Brau F, Cazareth J, Chabry J. 2009. Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3beta in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP-treated neurons. *PLoS One.* 4; 5491
- Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB. 1997. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 52: 261-281.
- Phillips W, Morton AJ, Barker RA. 2005. Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. *J Neurosci.* 14;11564-76
- Prochaska HJ, De Long MJ, Talalay P. 1985. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8232–8236.
- Przedborski S, Vila M. 2003. The 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.* 991, 189-198.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila MJ. 2004. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *Bioenerg Biomembr.* 36:375-9.
- Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. 2011. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol. Aspects Med.* 32:305-315.

- Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* 545:51–64.
- Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF. 2009. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose-Response.* 7:90-103.
- Rattan SI. 2008. Increased molecular damage and heterogeneity as the basis of aging. *Biol. Chem.* 389:267-272.
- Reale M, de Angelis F, di Nicola M, Capello E, di Iorio M, Luca Gd, Lugaresi A, Tata AM. 2012. Relation between Pro-inflammatory Cytokines and Acetylcholine Levels in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 3;12656-64.
- Ren YR, Nishida Y, Yoshimi K, Yasuda T, Jishage K, Uchihara T, Yokota T, Mizuno Y, Mochizuki HJ. 2006. Genetic vitamin E deficiency does not affect MPTP susceptibility in the mouse brain. *Neurochem.* 98;1810-6.
- Ren H, Jiang J, Mukamel SJ. 2011. Deep UV resonance Raman spectroscopy of β -sheet amyloid fibrils: a QM/MM simulation. *Phys Chem B.* 115:13955-62.
- Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. 2007. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 82:297–325.
- Riachi NJ, Arora PK, Sayre LM, Harik SIJ. 1988. Potent neurotoxic fluorinated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine analogs as potential probes in models of Parkinson disease. *Neurochem.* 50;1319-21
- Rogers J, Lue LF, Walker DG, Yan SD, Stern D, Strohmeier R, Kovelowski CJ. 2002. Elucidating molecular mechanisms of Alzheimer's disease in microglial cultures. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 39; 25-44
- Roginsky A. 2005. On the potential use of flavonoids in the treatment and prevention of pancreatic cancer. *In Vivo.* 19:61–67.

- Schapira AH, Olanow CW. 2004 .Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA*. 21; 358-64.
- Schapira AH. 2004. Excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. *Neurology*. 26;63
- Scheiber IF, Dringen R. 2013. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem*. 62:556-65.
- Schildknecht S, Pörtl D, Nagel DM, Matt F, Scholz D, Lotharius J, Schmieg N, Salvo-Vargas A, Leist M .2009. Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells.. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15; 23-35.
- Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF. 1997. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem*. 174:193-197.
- Schenck JF y Zimmerman EA. 2004. High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker? *NMR Biomed*.17; 433–445.
- Sen-Yung H, Chih-Yun H, Jung-Ru H. 2009. Identifying apoptosis-evasion proteins/pathways in human hepatoma cells via induction of cellular hormesis by UV irradiation. *J. Proteome Res*. 8:3977-3986.
- Shih AY, Li P, Murphy TH. 2005.A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J. Neurosci*. 25:10321–10335.
- Simunovic F, Yi M, Wang Y, Stephens R, Sonntag KC. 2010.Evidence for gender-specific transcriptional profiles of nigral dopamine neurons in Parkinson disease. *PLoS One*. 25;5
- Smigrodzki R, Parks J, Parker WD. 2004. High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson's disease and aging. *Neurobiol Aging*. 25; 1273-81.

- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119; 7-35.
- Stevenson DE, Hurst RD. 2007. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* 64:2900–2916.
- Subramanian T, Lieu CA, Guttalu K, Berg D. 2010. Detection of MPTP-induced substantia nigra hyperechogenicity in Rhesus monkeys by transcranial ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 36:604-9.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. 2004. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 72 ; 111-27.
- Tang SY, Halliwell B. 2010. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditiselegans* studies? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394:1–5.
- Tsai MJ, Lee EH. 1994. Differences in the disposition and toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in cultured rat and mouse astrocytes. *Glia.* 12:329-35
- Tatton WG, Greenwood CE, Seniuk NA, Salo PT. 1992. Interactions between MPTP-induced and age-related neuronal death in a murine model of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci.* 19:124-33
- Tuirán R, Partida V, Mojarro O, Zúñiga E. 2002. Tendencias y perspectivas de la fecundidad. *La Situación Demográfica de México.* Consejo Nacional de Población (CONAPO). México DF, pp. 29–48.
- Valles SL, Dolz-Gaiton P, Gambini J, Borrás C, Lloret A, Pallardo FV, Viña J. 2010. Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res.* 1312:138-44
- Van Rossum D, Hanisch UK. *Metab Brain Dis.* 2004. *Microglia.* 19:393-411.
- Von Bernhardi R. *Neurotox Res.* 2007. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. 12:215-32
- Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2

response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. Proc. Natl. Acad.Sci U.S.A. 101:2040–2045.

- Wang B, Zhu X, Kim YT, Li J, Huang S, Saleem S, Li R, Xu Y, Dore S, Cao W. 2012. Histone deacetylase inhibition activates transcription factor Nrf2 and protects against cerebral ischemic damage. Free Radic. Biol. Med. 52; 928-936.
- Wichmann T, DeLong MR. Ann N Y Acad Sci. 2003. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. 991:199-213.
- Wilson MJ, Kirby JD, Zhao Y, Sinha AA, Cooke PS. 1997. Neonatal hypothyroidism alters the pattern of prostatic growth and differentiation, as well as plasminogen activator and metalloprotease expression, in the rat. Biol Reprod. 56:475-82.
- Wilcock DM, Colton CA. J Alzheimers Dis. 2008. Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. 15:555-69
- Wu EY, Langston JW, Di Monte DA. 1992. Toxicity of the 1-methyl-4-phenyl-2, 3-dihydropyridinium and 1-methyl-4-phenylpyridinium species in primary cultures of mouse astrocytes. J Pharmacol Exp Ther. 262:225-30.
- Yan D, Dong J, Sulik KK, Chen SY. 2010. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response by tert-butylhydroquinone prevents ethanol-induced apoptosis in cranial neural crest cells. Biochem.Pharmacol. 80:144–149.
- Yankner, BA. 1996. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuro. 16, 921-932.
- Yao HH, Ding JH, Zhou F, Wang F, Hu LF, Sun T, Hu G. 2005. Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes. J Neurochem. 92:948-61.
- Zhang DD, Hannink M. 2003. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. Mol. Cell Biol. 23:8137–8151.

- Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. 2004. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell Biol.* 24:10941–10953.
- Zhang, D., Hu, X., Qian, L., O'Callaghan, J.P., Hong, J.S. 2010. Astroglialosis in CNS is there a role for microglia? *Mol. Neurobiol.* 41, 232-241
- Zhu Y, Carvey PM, Ling Z. 2006. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res.* 1090:35–44.

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jat.2841

Comparing the effects of two neurotoxins in cortical astrocytes obtained from rats of different ages: involvement of oxidative damage

Adriana Alarcón-Aguilar^{a†}, Viridiana Yazmín González-Puertos^{a†}, Armando Luna-López^b, Ambar López-Macay^{a†}, Julio Morán^c, Abel Santamaría* and Mina Königsberg^{a*}

ABSTRACT: Oxidative stress has been recognized as a potential mediator of cell death. Astrocytes play an active role in brain physiology responding to harmful stimuli by activating astrogliosis, which in turn has been associated either with survival or degenerative events. The characterization of the mechanistic actions exerted by different toxins in astrocytes is essential to understand the brain function and pathology. As age plays a critical role in degenerative processes, the aim of this study was to determine whether the administration of equimolar concentrations of two neurotoxins evoking different toxic patterns can induce differential effects on primary astrocytes obtained either from newborn or adult rats, with particular emphasis on those events linked to oxidative stress as a potential source of damage. Primary cortical astrocyte cultures derived from rat brains were exposed to 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) or beta-amyloid peptide (b-amyloid). Mitochondrial functionality and cell viability were determined as physiological parameters, whereas lipid and protein oxidation were used as markers of oxidative damage. The results of these experiments pointed towards a higher vulnerability to MPP+ over b-amyloid, on most of the tested markers. Hence, in order to allow a comprehensive evaluation of astrocytic responses against MPP+ intoxication, a third astrocyte group was included for dose-response experiments: astrocytes derived from aged rats. The present data indicate that the differences associated with age were mainly found in astrocytes exposed to MPP+ (25 and 50 mM) at 1-h treatment. Results are discussed in terms of the differential mechanisms involved in each model. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: b-amyloid peptide; astrocyte primary cultures; MPP+; oxidative stress; cytotoxicity

Introduction

Several neurodegenerative disorders in humans, including Alzheimer's and Parkinson's diseases (AD and PD, respectively), share an important feature: a particular vulnerability of neuronal cells to the noxious effects of reactive oxygen species (ROS) (Baillet *et al.*, 2010; Simonian and Coyle, 1996). It is currently accepted that oxidative stress plays a critical role in the establishment of brain damage not only through the structural and functional alterations that ROS produce to cell biomolecules, but also because they are potential mediators of cell death by either necrosis or apoptosis (Friedlander, 2003).

It is also known that the central nervous system (CNS) is highly susceptible to ROS because: (i) neuronal cells possess high concentrations of lipids that are more vulnerable to oxidation (Adibhatla and Hatcher, 2010); (ii) the CNS exhibits an elevated aerobic metabolism relying on glucose oxidation, hence inducing an increased mitochondrial activity, which in turn is known to be responsible for high ROS production (Fernández-Checa *et al.*, 2010); (iii) the CNS also presents low levels of antioxidant enzymes, in contrast with the high activity of some pro-oxidant enzymes, as well as a constant auto-oxidation of catecholamines and ascorbate.

Astrocytes are the most abundant glial population in the brain, representing more than 50% of the total cells in the cerebral cortex; they are known to play an active role in brain physiology, responding to neurotransmitters and modulating neuronal excitability and synaptic function (Volterra and Meldolesi, 2005). These cells are also essential in maintaining ion fluxes, pH and

*Correspondence to: Mina Königsberg, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535. C.P. 09340, México D.F., México. Email: mkf@xanum.uam.mx

Abel Santamaría, Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA. México D.F. 14269, Mexico

[†]Posgrado en Biología Experimental, UAMI, Mexico.

^aDepartamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F. 09340, Mexico

^bInstituto Nacional de Geriátria, SSA. México D.F. 14080, Mexico

^cDivisión de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510, Mexico

transmitter homeostasis at the synaptic interstitial fluid. In addition, they regulate blood flow and contribute to the energy metabolism (Sofroniew and Vinters, 2010). Noteworthy, it has also been reported that astrocytes protect normal functions of the CNS against oxidative stress (Takuma *et al.*, 2004), mainly because they produce and secrete several antioxidant enzymes (Dringen, 2000). Moreover, astrocytes are involved in responses to damage and stress in a multifactorial inflammatory response called reactive astrogliosis (Ting *et al.*, 2009). This response may be either harmful or beneficial, as reactive astrocytes can exert both pro- and anti-inflammatory effects. Of note, severe astrogliosis has been associated with a considerable number of neurological disorders (Sofroniew and Vinters, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Therefore, the physiological characterization of astrocytes and their related responses to damage are essential in understanding the brain function and pathology. The following toxins were chosen, upon the rationale that they mimic a variety of pathological events in the CNS:

- (1) Beta-amyloid (b-amyloid), a peptide containing 39–43 amino acid residues generated after amyloid precursor protein (APP) cleavage through b- and g-secretases activity. b-Amyloid is known to induce apoptotic cell death as a result of the unfolded protein response (UPR) (Lee *et al.*, 2010), and can induce inflammatory responses. Another suggested mechanism for its toxic effects is through a persistent stimulation of NMDA receptor-mediated transmission, which in turn might account for the beginning of the pathological changes associated with Alzheimer's disease (Peña *et al.*, 2006).
- (2) MPTP, a byproduct generated during meperidin synthesis, is recognized as a lipophilic compound capable of crossing the blood–brain barrier to be oxidized, mainly in astrocytes, throughout the action of monoamine oxidase B (MAO-B). MPTP is readily converted into 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), a toxic ion released from astrocytes, and selectively incorporated by the dopaminergic neurons through dopamine transporters, further inhibiting mitochondrial complex I and favoring ROS generation and cell demise (Przedborski and Vila, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Here, we decided to employ MPP+ instead of MPTP because although the later can be easily converted into the first to further abandon cells, part of this newly formed MPP+ could also exert toxicity in astrocytes by itself, but little is known about its effects. As it is difficult to establish the exact quantity of MPTP converted into MPP+, as well as the amount needed to induce toxicity, accurate concentrations of MPP+ were used in primary cultured astrocytes.

Because it is known that an increased glial reactivity is a common outcome of aging, and antioxidant content in the brain has been reported to diminish with age (Kanwar and Nehru, 2007), the purpose of this study was to determine in the first instance if cortical astrocytes derived from adult animals are more susceptible to the toxic effects of the tested agents than astrocytes from newborns, with particular emphasis on those events linked with oxidative damage as a potential source of injury. In addition, we investigated whether the administration of neurotoxins with different toxic profiles can induce differential effects on primary astrocytes obtained either from newborn or adult rats. Our results indicate that astrocytes exhibited a higher susceptibility to MPP+ over b-amyloid in long-term experiments.

The only difference associated with age was found in the mitochondrial functionality of cells exposed to MPP+. These results are discussed in terms of the differential mechanisms implicated in these two toxic models.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The reagents obtained from other sources are detailed throughout the text.

Animals

Astrocytes were isolated from the frontal cortex of neonatal (3 day old), adult (9 months old), and for some experiments, old (24 months old) albino Wistar rat brains (*Rattus norvegicus*), provided by the closed breeding colony of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Before being assigned to the experiments, adult and old animals were housed five per cage in polycarbonate cages and provided with a standard commercial rat diet (Harlan 2018S; Madison WI, USA) and water *ad libitum*. All the procedures carried out on animals were done strictly according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the Principles of the Mexican Official Ethics Standard 062-ZOO-1999.

Cortical Astrocytes Isolation and Culture

Astrocyte primary cultures were obtained according to a protocol established in previous studies (Lin *et al.*, 2007; McCarthy and de Vellis, 1980). For neonatal astrocytes, pools of three animal tissues were used, whereas tissues of four animals were pooled together for adult or old cultures. Cells were maintained routinely in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.01% glutamine, 0.15% glucose and 1% penicillin–streptomycin. The medium was replaced every 3 days. Cells were grown up at 37°C in 60-mm-diameter plates (Corning, Acton, MA, USA) in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂. All described experiments were performed after 2 weeks under *in vitro* conditions.

To ensure that the isolated cells were indeed astrocytes, cells were immunostained using polyclonal antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP). Under these conditions, cultures are known (and were confirmed) to contain more than 90% cells positive to GFAP. For immunofluorescence experiments, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. Immediately thereafter, the cells were incubated in blocking buffer [2% bovine serum albumin (BSA), 0.2% non-fat milk, 0.4% Triton X-100 in PBS] for 1 h at room temperature. The cells were then washed and incubated for one more hour with the primary antibody anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The cells were washed three times more with PBS-Tween 0.2% and incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor 594 anti-rabbit dilution 1:200). After four more washes, the cells were incubated with Hoechst stain (1 µg ml⁻¹) for 5 min to stain DNA and mark the nucleus. The cells were washed again twice and mounted with fluorescent mounting medium (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Images were obtained with a confocal microscope OLYMPUSBX-51W1 imaging at 30x with the Mercury Lamp, and

two filters: U-MWU2 330–385 nm excitation and 420 nm emission for HOECHST, and U-MRFPHQ 535–555 excitation and 570–625 nm emission for ALEXA FLUOR 594.

For Western blot analysis, 5×10^5 cells were seeded, trypsinized and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO_3 , 1 mg ml^{-1} aprotinin, 1 mM PMSF and 1 mg ml^{-1} leupeptin). Cell homogenates were incubated at 4 °C for 5–10 min, and centrifuged at 22 000 g at 4 °C for 20 min. The protein concentration in the supernatants was determined using a commercial Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules CA, USA) (Bradford, 1976). Cell lysates were separated in 13% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Invitrogen) for further incubation with anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Membranes were washed three times with TBS-Tween and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated a-mouse IgG secondary antibody (Pierce, Rockford, IL, USA) for 1 h. After three more washes, blots were revealed using a commercial chemiluminescent reagent (Supersignal[®]; Pierce).

Cytotoxic Treatments

After being preserved for 2 weeks under *in vitro* conditions, astrocytes were reseeded at a cell density of 3×10^5 cells per well on a 24-well multichamber plate (Corning, Acton, MA, USA), and 50 mM soluble b-amyloid (25–35 fragment) (Croce *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2011) or 50 mM MPP⁺ (Hazell *et al.*, 1997) were added to the culture media at 37 °C and 5% CO_2 . The concentrations used for b-amyloid and MPP⁺ were originally established on the basis of previous observations of other groups (Ferrera *et al.*, 2008). The experiments were performed in primary astrocytes derived from newborn or adult animals exposed to the toxins either for 5 or 72 h, with the aim of determining the short- and long-term responses for each age group. Previous reports have demonstrated that aged astrocytes are viable and serve for different experimental purposes (Lin *et al.*, 2007). In addition, H_2O_2 was used as a positive control for oxidative toxicity. To determine the optimum concentration of this agent, a series of pilot assays were carried out in primary astrocytes from newborn animals and treated with 100, 200, 300 or 400 mM H_2O_2 for 1 h.

Cell Viability

To determine cell viability, astrocytes were trypsinized and a 20-ml aliquot was stained with an equal volume of a 0.4% trypan blue physiological solution (trypan blue exclusion). The number of living cells in 10 ml of this suspension was scored using five fields of a hemocytometer under a phase-contrast optical microscope.

Mitochondrial Functionality

The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Mosmann, 1983) has been reported to quantify mitochondrial succinate dehydrogenase activity. This assay is commonly used to determine mitochondrial fitness and functionality (Cillero-Pastor *et al.*, 2011; Golomb *et al.*, 2012), and was therefore chosen as an indicator of cellular energy and metabolic status, although it is also often accepted as a marker of cell viability. MTT is a pale yellow substrate that produces a dark blue formazan product when the tetrazolium ring is

cleaved in active mitochondria, mostly by the succinate dehydrogenase. It has been shown that the amount of formazan generated per cell depends on the level of mitochondrial energetic metabolism, and that activated cells produce more formazan than the resting ones, supporting the idea that active mitochondria are required to generate a strong signal (Sánchez and Konigsberg, 2006). Briefly, cells were incubated with minimal essential medium (MEM)-fetal bovine serum (FBS) containing 0.5 mg ml^{-1} MTT for 4 h at 37 °C. The medium was discarded and 800 μl of extracting solution (HCl 0.04 M in isopropanol) was added to each well to dissolve the water-insoluble formazan salt. After 15 min of incubation at room temperature, the colored formazan salt was determined at 570 nm using a Beckman DU 650 spectrophotometer.

Lipid Peroxidation Assay

Specific concentrations of the toxins were used in order to determine the oxidative damage to lipids and proteins. For these assays, cells were seeded at a cell density of 5×10^6 cells per 60-mm-diameter plate (Corning). After 24 h, cells were treated either with 50 mM b-amyloid or 50 mM MPP⁺ for 5 or 72 h, or with 100 mM H_2O_2 for 1 h as a positive control.

Lipid peroxidation (LPX) was assessed in cells treated with different toxins by the assay of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) formation, according to a previous report (Zentella de Piña *et al.*, 2007). Immediately after being incubated, cells were scraped and pooled in 500 μl of the TBA reagent (containing TBA 0.125 g + trichloroacetic acid 375 μl + HCl 513 μl , in a 25-ml final volume), and re-incubated in a boiling water bath (94 °C) for 20 min. Samples were then kept on ice for 5 min and centrifuged at 3000 g for 15 min. The optical density was estimated in supernatants at a wavelength of 532 nm in a Beckmann DU 650 Spectrophotometer. The protein concentration was determined using a commercial Bradford reagent (Bio-Rad Hercules, CA, USA) (Bradford, 1976). The concentrations of malondialdehyde (MDA), expressed as nmol of MDA per mg of protein, were calculated by interpolation on a standard curve, normalized with protein content per sample, and expressed as a percent of MDA formed vs. control.

Production of the DNP Derivative of Oxidized Proteins

After being exposed to toxic treatments, cells were incubated with a 5 ml SDS (120 g l^{-1}) solution. Five min later, 10 ml of the DNPH solution (10 mmol l^{-1}) in HCl (2 mol l^{-1}) was added and the reaction was allowed to continue for 25 min, followed by the addition of 5 ml of a neutralizing solution, according to the Oxyblot protein oxidation detection kit described below.

Measurement of Protein Carbonyl by Immunoblotting of DNP Protein

Twenty-five micrograms of the DNP derivative of protein were separated by SDS-PAGE (12%) followed by Western blotting, using a polyvinylidene difluoride membrane, according to the protocol established for the Oxyblot protein oxidation detection kit (Catalog no. S7150; Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were then incubated with the primary antibody, specific to the DNP moiety. This step was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (goat anti-rabbit IgG) and directed against the primary antibody.

Blots were revealed using Immobilon Western chemiluminiscent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA).

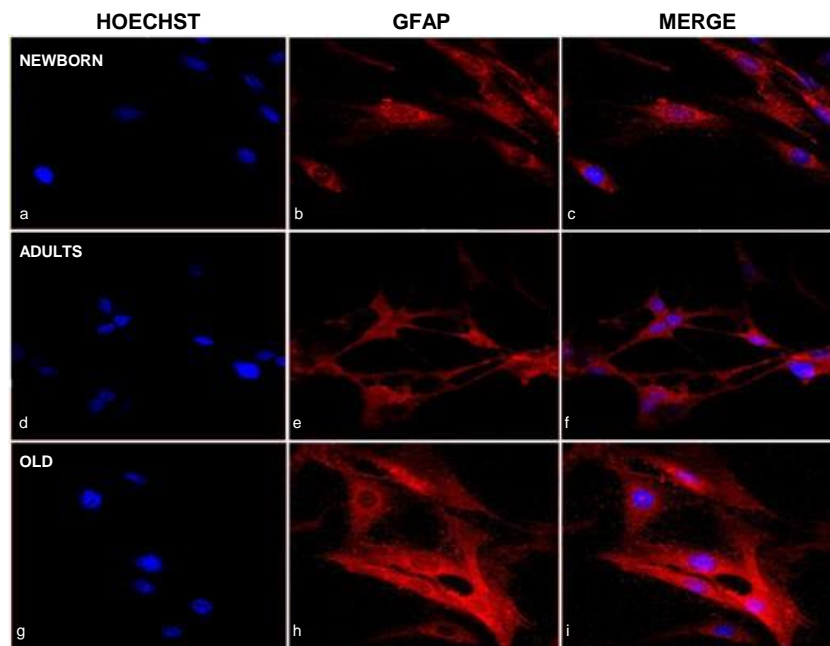
Statistical Analysis

Data are reported as mean values \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments per group performed by triplicate. A multivariate linear model was used to establish differences among treatments, markers, ages, times and concentrations of exposure tested. After running the corresponding hypothesis tests, comparisons using Bonferroni's method were applied. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

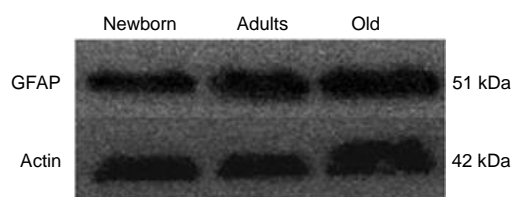
Results

Immunocytochemistry and Immunoblotting for the Assessment of Functional Astrocytes in Cell Cultures

The presence of functional cortical astrocytes in cultures from newborn, adult, and in some experiments, old Wistar rats, was assessed by immunocytochemical and immunoblotting assays (Fig. 1). Immunocytochemical images revealed the presence of active astrocytes for GFAP production, and the proportion of these cells was more or less similar in cultures from all ages (Fig. 1A). More than 90% of the cultured cells were indeed astrocytes. These



A



B

Figure 1. Representative astrocyte staining and immunodetection in cultures from newborn and adult rats. (A) Confocal microscopic images of astrocyte primary cultures from 3-day-old newborn (a, b, c), 9-month-old adult rats (d, e, f) and 24-month-old aged rats (g, h, i). In a, d and g, Hoescht staining (blue); in b, e and h, GFAP immunostaining (red); in c, f and i, merge. (B) Immunoblot analysis and densitometry showing the expression of GFAP protein in astrocyte primary cultures from newborn (3 days old), adult (9 months old) and old (24 months old) rats.

observations were confirmed by Western blot assays, demonstrating that the proportion of GFAP protein was the same in cultures from all ages (Fig. 1B).

H₂O₂ as a Toxic Positive Control

Figure 2 shows the results obtained when astrocytes were treated for 1 h with increasing concentrations of H₂O₂. Cell viability and mitochondrial functionality decreased in a dose-dependent manner; therefore, the lowest H₂O₂ concentration (100 μ M) at which approximately 50% of the cells were viable and functional, was chosen and used as a positive control for further experiments.

Long-Term Cytotoxic Effects

To discern whether there is a differential effect when astrocytes are exposed to diverse toxic insults for a long period of time, cells were exposed to the toxins for 72 h. Both toxins tested were able to decrease cell viability and functionality in a significant manner (Fig. 3A, B). As expected, the effect observed in mitochondrial functionality was more evident than that of viability, but no differences were found between the two age groups.

Cell viability diminished by approximately 60% in response to b-amyloid treatment ($P < 0.01$), 80% in the MPP⁺ treatment ($P < 0.01$) and 95% in the H₂O₂ treatment ($P < 0.001$) (Fig. 3A). Mitochondrial functionality was severely affected (Fig. 3B) by approximately 60–70% when astrocytes were exposed to b-amyloid treatment ($P < 0.05$), or completely lost in the MPP⁺ and H₂O₂ treatments ($P < 0.01$).

Figure 3C shows the results obtained from the LPX assay. All toxins induced LPX after 72 h of treatment; however, once again, no differences were found between the two age groups. Interestingly, LPX levels were lower after 72 h than 5 h of treatment, probably because of a high mortality prevailing at the long-term condition.

A representative oxyblot is presented in Fig. 4 to contrast protein oxidation among toxins after 72 h of treatment in astrocytes from newborn (Fig. 4A) and adult (Fig. 4B) rats. It seems evident that proteins are more oxidized in MPP⁺ and H₂O₂ treatments, in

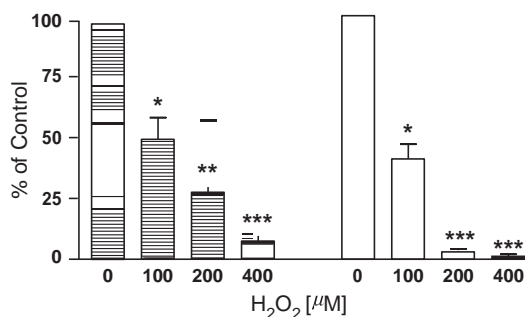


Figure 2. Cell viability and mitochondrial functionality in H₂O₂-treated astrocytes. Cellular viability (shredded bars) and mitochondrial functionality (white bars) were determined in primary cortical astrocytes from newborn animals at different H₂O₂ concentrations after 1-h exposure, as described in Materials and Methods, in order to determine the optimum concentration to use this agent as a control in further oxidative toxicity assays. Each point represents the mean \pm standard deviation (SD) of nine determinations performed in three independent experiments. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered.

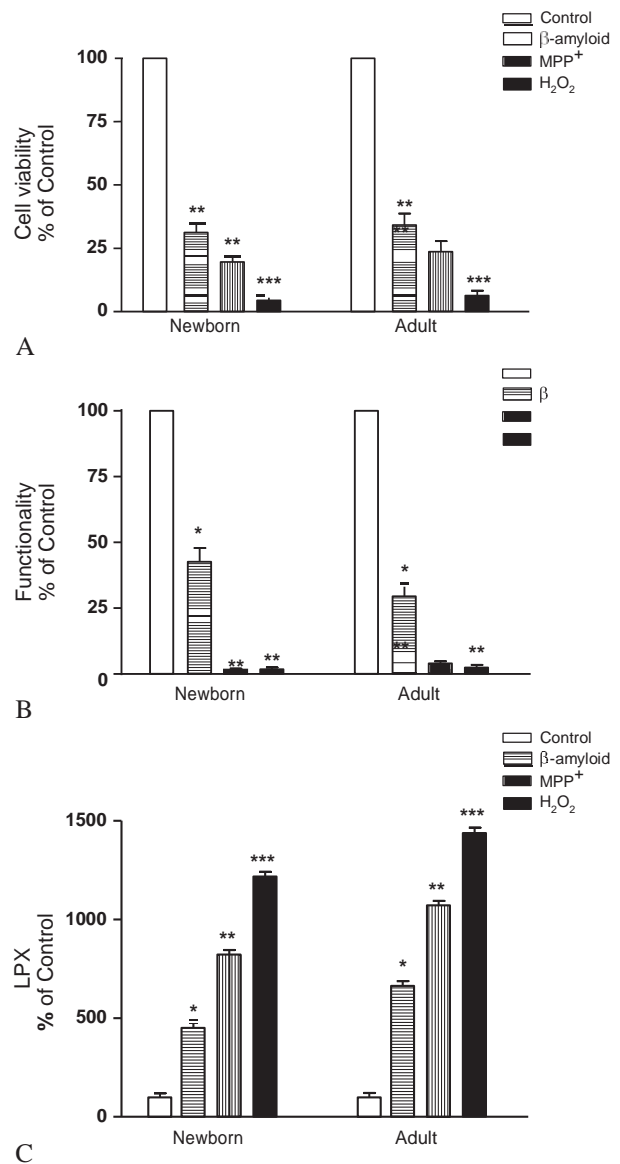


Figure 3. Long-term cytotoxic effects of b-amyloid and 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in rat cultured astrocytes. Cellular viability (A), mitochondrial functionality (B) and lipid peroxidation (C) were determined in primary astrocytes derived from newborn and adult animals after 72-h treatment with each toxin, as described in Materials and Methods. Each point represents the mean \pm standard deviation (SD) of nine determinations performed in three independent experiments. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered.

concordance to all other results presented here. No differences were found in protein damage between the two age groups.

Short-Term Cytotoxic Effects

To determine if a more evident effect could be observed between the age groups, the same experiments were performed at a shorter time. Figure 5 illustrates the data obtained after 5 h of exposure to toxic treatments. In regard to the effect of b-amyloid, this toxin significantly diminished cell viability and functionality by approximately 40% and 60–70% (respectively), when compared with untreated control cells (Fig. 5A, B); however,

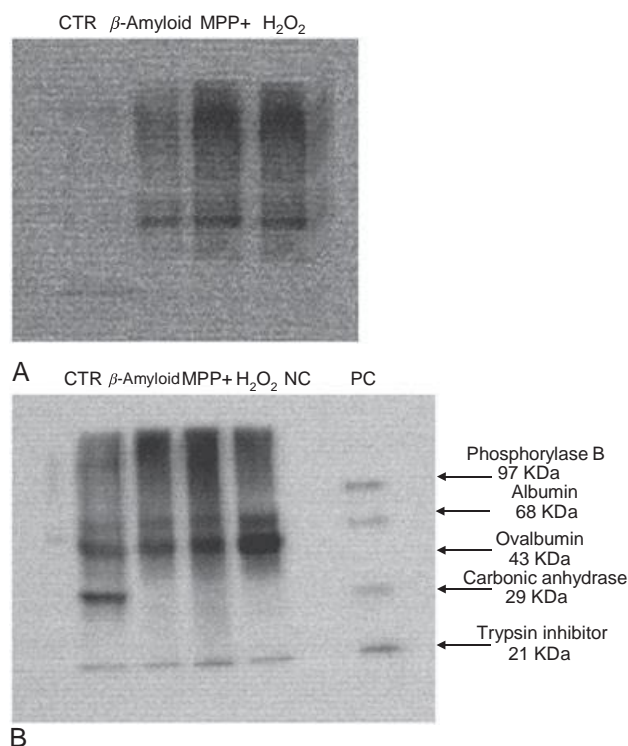


Figure 4. Protein oxidation estimated after long-term treatments with β -amyloid and 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) to rat-cultured astrocytes. Representative oxyblots obtained of primary astrocytes from newborn (A) and adult (B) animals after a 72-h exposure to the toxins β -amyloid, MPP⁺ and H₂O₂ (as a positive control for oxidative toxicity). The negative control (NC) and positive control (PC) are internal standards provided by the commercial kit. The oxyblots were performed two times in three independent experiments, as described in Materials and Methods. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered.

when cells derived from adult animals were compared with cells from newborns, no statistical differences were found.

A significant decrease in cell viability was found in astrocytes isolated from the two age groups when treated with MPP⁺ and compared with the control (50–55%), but when compared with each other, no differences were observed (Fig. 5A). Interestingly, when mitochondrial functionality was analyzed, a significant decrease was found between MPP⁺-treated and control cells, as well as among the two age groups. Astrocytes derived from newborns decreased their functionality by approximately 50%, whereas cells derived from adults declined this marker by approximately 88% (Fig. 5B). A similar result was observed for H₂O₂-treated cells, where the fall in mitochondrial functionality was more evident in cells derived from adults.

Figure 5C shows the results of LPX assessed after the exposure of astrocytes to the different toxicants. All toxins tested produced significant oxidative damage to lipids when compared with control cells: β -amyloid ($P < 0.05$), MPP⁺ ($P < 0.01$) and H₂O₂ ($P < 0.001$).

The images presented in Fig. 6 illustrate protein oxidation. In order to compare the oxidative damage between ages, proteins obtained from newborn and adult astrocytes were assessed in parallel and run in the same gel. To better appreciate differences owing to the toxic model used, protein extracts were analyzed and grouped to compare the oxidative effect of the toxins at 5 h in astrocytes from newborn (Fig. 6A) and adult (Fig. 6B) rats. In agreement with those data obtained from LPX assay,

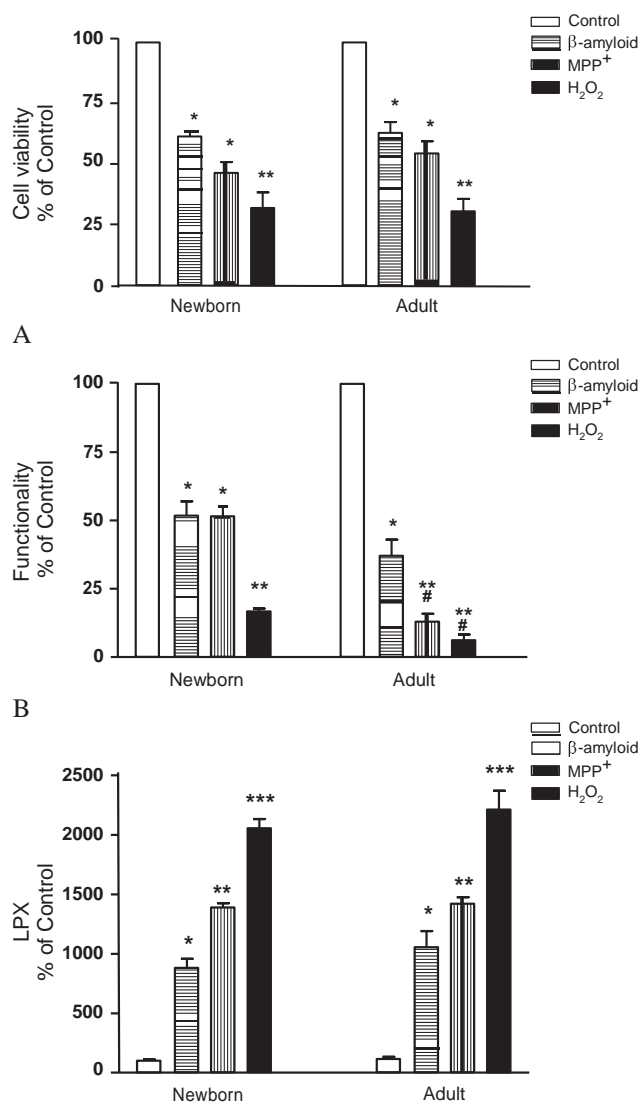


Figure 5. Short-term cytotoxic effects of β -amyloid and 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) on rat cultured astrocytes. Cellular viability (A), mitochondrial functionality (B) and lipid peroxidation (C) were determined in primary cortical astrocytes derived from newborn and adult animals after 5-h treatment with each toxin, as described in Materials and Methods. Each point represents the mean \pm standard deviation (SD) of nine determinations performed in three independent experiments. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered. Statistical difference between newborn and adult derived astrocytes was designated as #.

astrocytes treated with MPP⁺ and H₂O₂ showed the highest oxidative damage, whereas β -amyloid-treated cells presented only a moderate effect. Also, in general terms, astrocytes derived from adult animals were more affected than those from newborn rats, both during short- and long-term exposures, indicating that there is a higher oxidative damage related to age.

In summary, even although it is clear that alterations in astrocytes are different when they are exposed to dissimilar toxic insults, the only variation associated with age found in response to the toxins used was observed as a higher susceptibility to protein oxidation in astrocytes from adult animals, accompanied by a decreased mitochondrial functionality in the MPP⁺ and H₂O₂ conditions (Fig. 6).

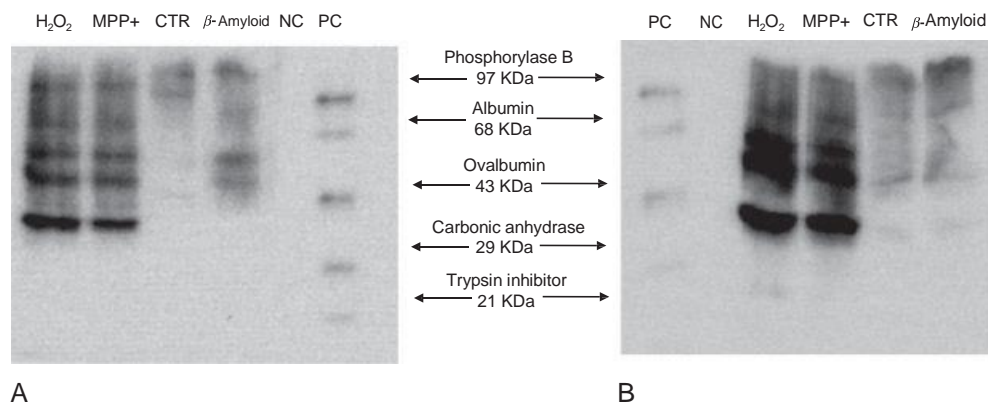


Figure 6. Protein oxidation estimated after short-term treatments with b-amyloid and 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) to rat-cultured astrocytes. Representative oxyblots obtained of primary astrocytes from newborn (A) and adult (B) animals after a 5-h exposure to the toxins b-amyloid, MPP+ and H_2O_2 (as a positive control for oxidative toxicity). The negative control (NC) and positive control (PC) are internal standards provided by the commercial kit. The oxyblots were performed two times in three independent experiments, as described in Materials and Methods. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered. Statistical difference between newborn and adult derived astrocytes was designated as #.

MPP+ Dose-response Studies Introducing Astrocytes Derived from Aged Rats

So far, our results showed that MPP+ reduced cellular viability and functionality notably more than b-amyloid, and this effect showed a significant difference between age groups only at the short-term exposure (5 h), suggesting that at long-term exposure (72 h), the cells were so damaged that no difference could be observed between them. Therefore, in order to determine if a major susceptibility of older astrocytes could become evident, we decided to perform dose-response studies at lower concentrations (10, 25, 50 and 100 mM), reducing the exposure time (5, 3 and 1 h).

To further allow a comprehensive evaluation of astrocytic responses, it was worth introducing a third astrocyte group: astrocytes derived from aged rats (24 months) (Fig. 1A, B). As these experiments were performed with three age groups, from now on, astrocytes derived from old rats will be abbreviated as OA, whereas astrocytes from adult and newborn rats will be called as AA and NA, respectively.

Our data show that at 5 and 3 h, most AA and OA died, thus making it very difficult to observe differences between the ages (Fig. 7A, B). Specifically, at 5 h (Fig. 7A), even with the lower MPP+ concentration (10 mM), 63% of the OA, and 57% of the AA and NA died. These were more evident at higher concentrations (50 and 100 mM), where more than 95% of OA and AA died, and only 23% (50 mM) and 11% (100 mM) of NA survived. At 3 h, the only difference between the groups was observed at the higher concentrations. At 50 mM, 74% of the OA died whereas AA and NA resisted more (62% of deaths). Finally at 100 mM, 88% of OA did not survive, and 78% of AA and NA died.

Interestingly, only at 1 h were the differences detectable, and cellular viability significantly decreased in all age groups of cultured astrocytes. At 1 h, OA exhibited a higher sensibility to the toxin, even at the lower concentrations tested (10 and 25 mM), while a significant difference between AA and NA was only observed at 50 mM MPP+ treatment. Specifically, the 25 mM MPP+ concentration decreased cellular viability by 22% for NA, 35% for AA and 45% for OA ($P < 0.05$), whereas the 50 mM concentration decreased by 30% for NA, 40% for AA and 60% for OA ($P < 0.05$) (Fig. 7C).

In concordance with data about cell viability, not many differences were found in functionality among groups after the 3- and 5-h treatments (Fig. 8A, B). After 5 h of 10-mM treatment, OA showed a 43% decrease in functionality whereas AA and NA only decreased by 17% and 10%, respectively. While at the higher concentration (100 mM), OA and AA diminished their functionality in 75% and NA in 60%. In contrast, after the 1-h treatment, and with the 25 mM MPP+ concentration, there was a significant decrease in cellular functionality among groups: 10% NA, 20% AA and 24% OA ($P < 0.001$) (Fig. 8C).

LPX was also assessed in order to determine oxidative damage at these MPP+ concentrations and time points. Our results showed a significant increase in LPX, observed since the lowest concentration (Fig. 9). In agreement with previous data, differences among the age groups were found after 1-h treatment at 25 and 50 mM MPP+. Particularly, LPX increased 0.5 times in NA, 2.7 times in AA and 3 times in OA after 25 mM MPP+, when compared with untreated cells ($P < 0.001$). Astrocytes exposed to 50 mM MPP+ increased lipid oxidative damage by 3 times in NA, 3.6 times in AA and 3.9 times in OA ($P < 0.001$) (Fig. 9C).

Discussion

Considering that the brain is highly dependent on a glucose and oxygen supply, and that it also contains elevated amounts of unsaturated lipids and low levels of antioxidant enzymes, it is not surprising for this organ to become susceptible to oxidative damage, and therefore, several neurological disorders have been related to oxidative stress (Baillet *et al.*, 2010; Fernández-Checa *et al.*, 2010).

Astrocytes are now being studied with a renewed interest as new features of their physiology and function are being discovered. Astrocytes regulate the synaptic transmission as part of the tripartite synapse (Halassa *et al.*, 2009); they maintain the blood-brain barrier integrity (Sofroniew and Vinters, 2010), as well as the brain cholesterol levels (Chen *et al.*, 2012) and copper homeostasis (Scheiber and Dringen, 2012). Another important facet of these cells is that they decrease their neuroprotective capacity during aging (Pertusa *et al.*, 2007), thereby playing critical roles in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases

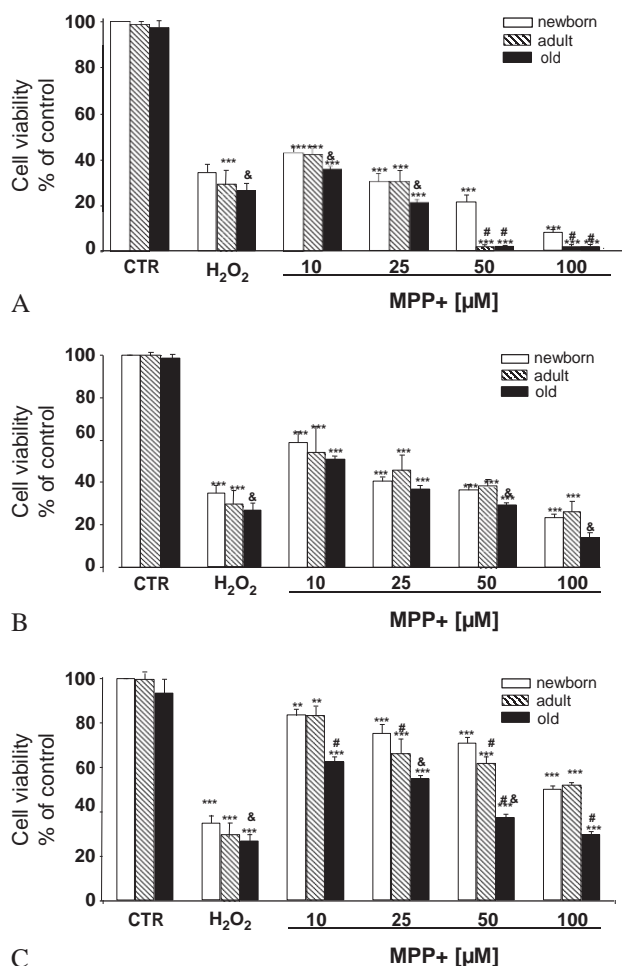


Figure 7. Cell viability in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-treated astrocytes: dose-response curve. Primary astrocytes derived from newborn, adult and old rats were treated with different MPP⁺ concentrations (10, 25, 50 and 100 μM) for 5 (A), 3 (B) and 1 h (C). Cell viability was assessed as described in Materials and Methods, and was normalized against newborn astrocytes as a control, which was considered 100%. 100 mM H₂O₂ for 1 h H₂O₂ was used as a positive control for oxidative damage. Each point represents the mean ± standard deviation (SD) of nine determinations performed in three independent experiments. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered; i.e. treated newborn (NA), adult (AA) and old astrocytes (OA) vs. untreated NA. Statistical difference between AA and OA vs. NA treated with the same MPP⁺ concentration was designated as & ($P < 0.05$); statistical difference between AA vs. OA treated with the same MPP⁺ concentration was designated as # ($P < 0.05$).

such as Alzheimer's disease (Bhat *et al.*, 2012) and Rett syndrome (Molofsky *et al.*, 2012). Therefore, it is of paramount importance to understand their physiology and susceptibility to toxics.

In this study, we compared the effects of equimolar concentrations of two different neurotoxins that have been used to mimic some specific features observed in neurodegenerative diseases by enhancing free radical production and oxidative stress. For this purpose, we first validated our experiments through a positive control of cell damage, namely H₂O₂. This agent accurately induced damage to cells, which is traditionally linked with oxidative damage, as demonstrated throughout the results of the present study. Therefore, H₂O₂ was included in further experiments for comparative purposes as another toxic

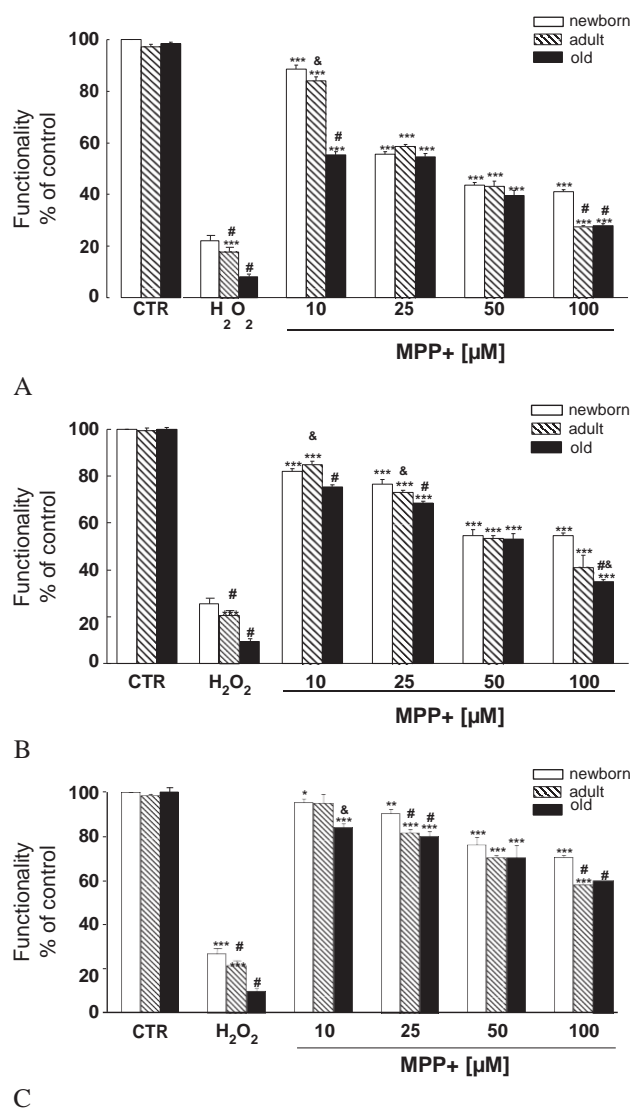


Figure 8. Functionality in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-treated astrocytes: dose-response curve. Primary astrocytes derived from newborn, adult and old rats were treated with different MPP⁺ concentrations (10, 25, 50 and 100 μM), for 5 (A), 3 (B) and 1-h (C). Functionality was determined measuring MTT as described in Materials and Methods and was normalized against NA as the control, which was considered 100%. 100 mM H₂O₂ for 1 h H₂O₂ was used as a positive control for oxidative damage. Each point represents the mean ± standard deviation (SD) of nine determinations performed in three independent experiments. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered; i.e. treated NA, AA and OA vs. untreated NA. Statistical difference between AA and OA vs. NA treated with the same MPP⁺ concentration was designated as & ($P < 0.05$); Statistical difference between AA vs. OA treated with the same MPP⁺ concentration was designated as # ($P < 0.05$).

paradigm. In light of the consistent effects exhibited by this pro-oxidant compound, we considered all our experiments as satisfactorily accurate and reproducible.

Effects of b-Amyloid on Toxic Markers and Oxidative Damage in Astrocytes

With regard to the effects of b-amyloid, it is known that during the progression of AD, the neurological dysfunction is preceded

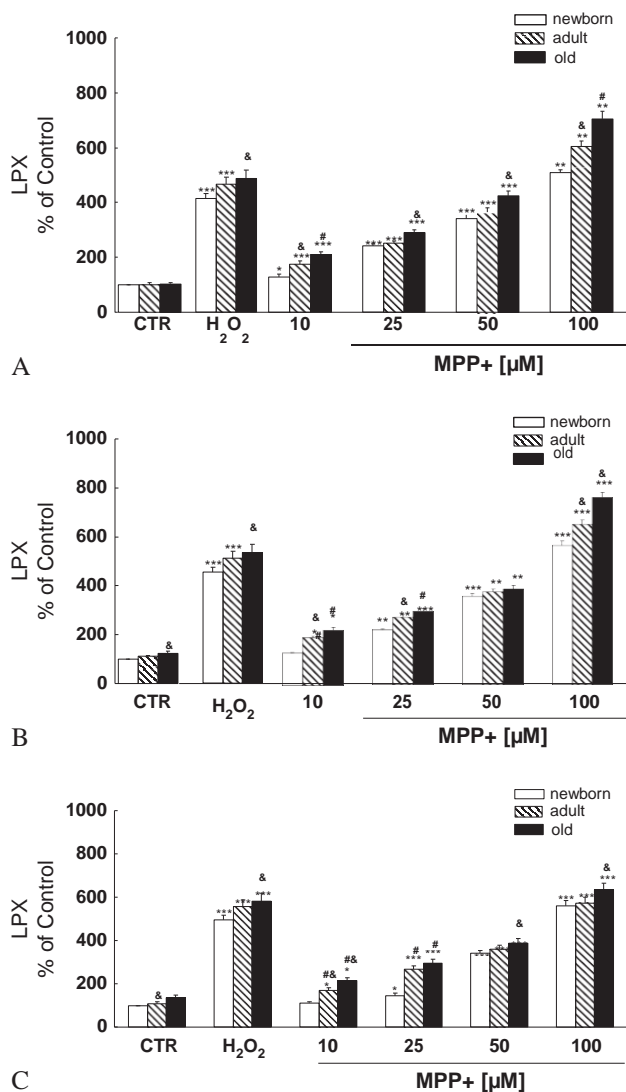


Figure 9. Lipid peroxidation in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-treated astrocytes: dose-response curve. LPX was determined in NA, AA and OA after MPP⁺ treatment with different concentrations (10, 25, 50 and 100 μM), for 5 (A), 3 (B) and 1 h (C) as described in Materials and Methods. H₂O₂ (100 μM for 1 h) was used as a positive control for LPX. Each point represents the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments performed by triplicate. Statistical significance with respect to untreated cells: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) were considered; i.e. treated NA, AA and OA vs. untreated NA. Statistical difference between AA and OA vs. NA treated with the same MPP⁺ concentration was designated as & ($P < 0.05$); statistical difference between AA vs. OA treated with the same MPP⁺ concentration was designated as # ($P < 0.05$).

by the development of fibrillar depositions of this peptide (Arnold *et al.*, 1998). As mentioned previously, the induction of reactive astrocytes, or astrogliosis, is necessary to protect cells in the CNS; however, this response involves the release of pro-inflammatory cytokines, ROS, RNS, complement factors, etc., and all together are able to promote cellular damage (Reale *et al.*, 2012). Previous studies under *in vivo* and *in vitro* conditions have shown that b-amyloid has a toxic effect on neurons, whereas it activates astroglia (Malchiodi-Albedi *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2002). Of note, there are some reports where astrocytes are supposed to protect neurons against the harmful effects induced by b-amyloid (Giulian *et al.*, 1993; Wilson, 1997),

whereas others mention that astrocytes enhance b-amyloid toxicity (Hu *et al.*, 1998; Johnstone *et al.*, 1999; Malchiodi-Albedi *et al.*, 2001). Our results suggest that the decrease in cell viability during the short- and long-terms of b-amyloid treatment is related to a mechanism that involves generation of oxidative stress expressed as lipid and protein oxidative damage.

Further considerations are needed for b-amyloid toxicity. For instance, calcium mishandling and glutathione depletion are probably mediating astrocytic damage in mixed astrocytes/neurons cultures (Abramov *et al.*, 2004). Mitochondrial impairment and oxidative stress have also been implicated in cultured rat astrocytes as part of the toxic pattern exerted by b-amyloid (Bisaglia *et al.*, 2004), and this was confirmed in this study. In turn, these two events might be related to the activation of NADPH oxidase, a pro-oxidant enzyme, as further suggested by Abramov *et al.* (2004). Moreover, although the direct actions of b-amyloid on NMDA receptors and further excitotoxicity have been readily reported (Peña *et al.*, 2006), it is unlikely that this toxic mechanism could account for the peptide toxicity exerted on cultured astrocytes in our study as it has been demonstrated that functional NMDA receptors are not currently expressed by astrocytes in cell culture (revised by Matyash and Kettenmann, 2010).

We also found that astrocytes exposed to b-amyloid (fragment 25–35) exhibited mild resistance, being the less harmful among the toxic models tested with regard to the degree of damage exerted on these cells. This result may be as a result to a biphasic effect of b-amyloid already reported for astrocytes in culture, where these cells were shown to be resistant for short times to different fragments of the toxin (Pentreath and Mead, 2004). Although in our study astrocytes showed moderate resistance, they mostly suffered severe alterations, making them vulnerable to the toxin by mechanisms already described above. An additional consideration should be made with the findings of Paradisi *et al.* (2004), who found that astrocytes unexposed to b-amyloid might be protective for cultured neurons, but when exposed to b-amyloid, astrocytes not only suffered toxicity, but also contributed to neuronal cell damage. Thus, it seems crucial for astrocytic-associated resistance to deal with b-amyloid toxicity before they can protect other cell types. But, by which mechanism(s) astrocytes could eventually resist toxicity induced by b-amyloid or other toxins? It seems that, as long as these cells better preserve their antioxidant capacities through the activation of antioxidant enzymes, they could be more resistant (Jeong *et al.*, 2005; Valles *et al.*, 2010). Therefore, an antioxidant capacity might be the clue in this and other paradigms to counteract toxicity.

Effects of MPP⁺ on Toxic Markers and Oxidative Damage in Astrocytes

While dopaminergic neurons are vulnerable to the toxic actions of MPTP owing to its ability to accumulate and retain MPP⁺, only a few reports suggest that MPP⁺ can directly exert damage on cultured astrocytes from rats. For instance, there is evidence showing that MPP⁺ causes impaired energy in astrocytes by affecting mitochondrial function, further altering glutamate clearance (Di Monte *et al.*, 1999). In addition, it has been suggested that MPP⁺ toxicity in cultured astrocytes depends on oxidative and nitroergic stress (Tsai and Lee, 1998). This evidence was preceded by comparative studies demonstrating a differential ability to accumulate MPP⁺ and express toxicity between rats and mice, suggesting that cultured astrocytes from the first species accumulate less MPP⁺ while express toxicity at higher

concentrations (Tsai and Lee, 1994). This is relevant because, in contrast to mice astrocytes that accumulates more MPP⁺ and are more vulnerable (Wu *et al.*, 1992), it seems that the toxicant could be acting by different mechanisms in rat astrocytes. Altogether, this evidence demonstrates that astrocytes can be vulnerable to MPP⁺ owing to the limited ability of these cells to counteract the many toxic actions of this metabolite once it is available in the medium. The relevance of this study is that it provides evidence, for the first time, on the vulnerability of astrocytes obtained from rats of different ages. Our results related to astrocytes from newborns agree with those that have been reported by other groups, where the concentrations used are in the same range (10–100 mM) (Chen *et al.*, 2008; Chuang and Chen, 2004; Hu *et al.*, 2005). Similarly to b-amyloid, MPP⁺ was able to induce oxidative damage to lipids and proteins, confirming that the patterns exerted by these two toxic agents are related to pro-oxidant mechanisms. Of note, the only significant difference found between newborn and adult mitochondrial dysfunction was observed for the MPP⁺ treatment at 5 h (at 72 h almost all cells of both culture conditions were assumed to be dead). This result is relevant as MPP⁺ is produced in astrocytes and released to the extracellular space, where it is selectively taken by the dopaminergic neurons, causing mitochondrial damage. However, here we demonstrated that, along with the often reported damage that is currently in progress in neuronal cells owing to MPTP transformation by astrocytes, these glial cells are also susceptible to be damaged by MPP⁺.

As we found a significant failure in mitochondrial function in response to MPP⁺ treatment, it was interesting to perform a dose-response study at lower concentrations and shorter exposure times, because during the longer treatments, cells were so damaged that no difference could be observed between them. To allow a comprehensive evaluation of astrocytic responses, astrocytes derived from aged rats were also used in these experiments. Our data show that the differences among ages were more evident after 1 h treatment at 25 and 50 mM; at this time point, it was clear that when an oxidant condition is induced with MPP⁺, astrocytes viability and functionality diminish significantly in direct proportion to the age of the group tested. Moreover, oxidative damage, defined as lipid peroxidation, also increased with age. These results may be explained according to Harman's free radicals theory of aging (1956), which postulates that the decrease in the biochemical and physiological functions associated with aging are because of an increase in accumulated oxidative damage. However, it would be interesting to further explore if the mechanism in astrocytes is the same as in neurons, especially in consideration of the differential susceptibility of adult astrocytes found in this study. Moreover, Chuang and Chen (2004) reported that the astrocytoma cell line U373MG responds to oxidative stress by eliminating ROS mainly through the GSH antioxidant system, but this is just effective at low MPP⁺ treatments.

For further consideration in regard to MPP⁺ toxicity is the fact that it has been recently demonstrated that astrocytes from a human origin are capable of attenuating oxidative damage produced by this toxin when treated with the cruciferous nutraceutical 3H-1,2-dithiole-3-thione, which in turn is responsible for upregulation of phase 2 antioxidant enzymes and recovery of GSH levels (Jia *et al.*, 2009). Whether rat astrocytes could also be able to respond through these protective mechanisms remain to be elucidated. In the meantime, it should be emphasized that human and rat astrocytes are different, and so, comparative studies on their properties should be performed in the near future. Therefore, care must be taken when interpreting and extrapolating the results obtained with

astrocytes from these two species. This is particularly relevant as mitochondrial and general functioning of astrocytes is known to be crucial for resistance against MPP⁺ toxicity through different mechanisms, including an adequate reuptake of glutamate (Di Monte *et al.*, 1999) via II and III metabotropic receptors (Yao *et al.*, 2005).

Another original contribution of our work was the demonstration of an early toxic effect exerted by MPP⁺ in rat astrocytes. Several toxic conditions evoked by MPTP and MPP⁺ have been tested in mouse astrocytes (Di Monte *et al.*, 1992; Mallajosyula *et al.*, 2008), but only a limited number of studies have brought attention to rat astrocytes, in spite of the fact that it has been shown that they undergo toxicity induced by these agents in a similar manner (Tsai and Lee, 1994). Therefore, intensive research in rat astrocytes challenged by these agents is still required in order to learn more about their responses and properties.

In summary, here we described for the first time an age-, time-, and treatment-dependent differential susceptibility of rat cultured astrocytes to toxic insults. The effects of two neurotoxic agents acting through different mechanisms served to establish these differential patterns. While astrocytes were consistently sensitive to a toxin that is known to produce various toxic effects (b-amyloid), including auto-aggregation, inflammation and excitotoxicity, a direct action of MPP⁺ on mitochondrial function was more intense in regard to its toxic potency. Therefore, it is likely that exerting a toxic action on mitochondria results in much more potent and sooner toxicity in astrocytes than moderately stimulating oxidative damage and activating the inflammatory processes. Nonetheless all of these models recruited oxidative damage as part of their toxic events, suggesting that this process is actively regulating astrocytic responses to toxic insults. By which precise means these differences are expressed between models? This is a question needing further clarification. In the meantime, and for further consideration, it can be considered that cultured astrocytes represent an interesting and promising biological tool for these comparative studies, although their main limitation lies in the fact that it does not involve the intricate relationships between neurons and glial cells, and so, the way astrocytes behave under these controlled experimental conditions might not completely represent a situation of a given human pathology. In this regard, mixed cultures will bring us more accurate information on these processes in the near future. In addition, it has been demonstrated that there are a number of regional morphological and functional differences between astrocytes under 'normal' and pathological conditions (including functional gap junctional coupling, expression of transmitter receptors, membrane currents and glutamate transporters), as well as among astrocytes from humans and rats (Matyash and Kettenmann, 2010), and together, these differences could limit the representativeness and usefulness of primary cultures of rat astrocytes to accurately mimic models of neurodegenerative disorders. Therefore, astrocytes remain to be fully explored in the near future.

Acknowledgements

The authors would like to thank María Guadalupe Domínguez-Macouzet from UNAM, and Dr Rocío González-Vieira from UAM-I for technical support and animal supply, respectively, as well as to Lic. Joel Kipi Turok for English editing of the manuscript. This work was supported by CONACyT's grants CB-2006-1-59659 and CB-2012-1-178349. As well as the "Red Temática de Investigación en Salud y Desarrollo Social" from CONACyT A. Alarcón-Aguilar, Y. González-Puertos and A. López-Macay are CONACyT scholarship holders.

References

- Abramov AY, Canevari L, Duchon MR. 2004. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1742: 81–87.
- Adibhatla RM, Hatcher JF. 2010. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 12: 125–169.
- Arnold SE, Smutzer GS, Trojanowski JQ, Moberg PJ. 1998. Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 762–775.
- Baillet A, Chantepedrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. 2010. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 35: 1530–1537.
- Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C. 2012. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7: e45069.
- Bisaglia M, Venezia V, Biglieri M, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G. 2004. Alpha-Glycerylphosphorylethanolamine rescues astrocytes from mitochondrial impairment and oxidative stress induced by amyloid beta-peptides. *Neurochem. Int.* 44: 161–170.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Chen H, Sen W, Jian-Hua D, Gang H. 2008. Edaravone protects against MPP⁺-induced cytotoxicity in rat primary cultured astrocytes via inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *J. Neurochem.* 106: 2345–2352.
- Chen J, Zhang X, Kusumo H, Costa LG, Guizzetti M. 2012. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1831: 263–275.
- Chuang JI, Chen TH. 2004. Effect of melatonin on temporal changes of reactive oxygen species and glutathione after MPP⁺ treatment in human astrocytoma U373MG cells. *J. Pineal Res.* 36: 117–125.
- Cillero-Pastor B, Martin MA, Arenas J, López-Armada MJ, Blanco FJ. 2011. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells. *BMC Musculo. Skelet. Disord.* 8: 42.
- Croce N, Dinallo V, Ricci V, Federici G, Caltagirone C, Bernardini S, Angelucci F. 2011. Neuroprotective effect of neuropeptide Y against b-amyloid 25-35 toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with increased neurotrophin production. *Neurodegener Dis* 8: 300–309.
- Di Monte DA, Tokar I, Langston JW. 1999. Impaired glutamate clearance as a consequence of energy failure caused by MPP⁺ in astrocytic cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158: 296–302.
- Di Monte DA, Wu EY, Langston JW. 1992. Role of astrocytes in MPTP metabolism and toxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 11: 219–228.
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62: 649–671.
- Fernández-Checa JC, Fernández A, Morales A, Marí M, García-Ruiz C, Colell A. 2010. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9: 439–454.
- Ferrera P, Mercado-Gómez O, Silva-Aguilar M, Valverde M, Arias C. 2008. Cholesterol potentiates beta-amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem. Res.* 33: 1509–1517.
- Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348: 1365–1375.
- Giulian D, Vaca K, Corpuz M. 1993. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* 13: 29–37.
- Golomb E, Matza D, Cummings CA, Schwab H, Kodavanti UP, Schneider A, Houminer E, Korach A, Nyska A, Shapira OM. 2012. Myocardial mitochondrial injury induced by pulmonary exposure to particulate matter in rats. *Toxicol. Pathol.* 40: 779–788.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2009. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology* 57: 343–346.
- Hazell AS, Itzhak Y, Liu H, Norenberg MD. 1997. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 68: 2216–2219.
- Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van-Eldik LJ. 1998. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res.* 2: 195–206.
- Hu LF, Wang S, Shi XR, Yao HH, Sun YH, Ding JH, Liu SY, Hu G. 2005. ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP⁺ on SH-SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *J. Neurochem.* 94: 1570–1579.
- Jeong JC, Yoon CH, Lee WH, Park KK, Chang YC, Choi YH, Kim CH. 2005. Effects of Bambusae concretio Salicea (Chunchukhwang) on amyloid beta-induced cell toxicity and anti-oxidative enzymes in cultured rat neuronal astrocytes. *J. Ethnopharmacol.* 98: 259–266.
- Jia Z, Zhu H, Li Y, Misra HP. 2009. Cruciferous nutraceutical 3H-1,2-dithiole-3-thione protects human primary astrocytes against neurocytotoxicity elicited by MPTP, MPP⁺, 6-OHDA, HNE and acrolein. *Neurochem. Res.* 34: 1924–1934.
- Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J. Neuroimmunol.* 93: 182–193.
- Kanwar SS, Nehru B. 2007. Modulatory effects of N-acetylcysteine on cerebral cortex and cerebellum regions of ageing rat brain. *Nutr. Hosp.* 22: 95–100.
- Lee Y, Lee KS, Lee HJ, Kim H, Noh YH, Yu K, Jung HY, Lee SH, Lee JY, Youn YC, Jeong Y, Kim DK, Lee WB, Kim SS. 2010. Activation of PERK signaling attenuates Abeta-mediated ER stress. *PLoS One* 5: e10489.
- Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourke W, Muller E, Lechleiter JD. 2007. Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol. Aging* 28: 99–111.
- Malchiodi-Albedi F, Domenici MR, Paradisi S, Bernardo A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. 2001. Astrocytes contribute to neuronal impairment in beta A toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons. *Glia* 34: 68–72.
- Mallajosyula JK, Kaur D, Chinta SJ, Rajagopalan S, Rane A, Nicholls DG, Di Monte DA, Macarthur H, Andersen JK. 2008. MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS One* 3: e1616.
- Matyash V, Kettenmann H. 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* 63: 2–10.
- McCarthy KF, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85: 890–902.
- Molofsky AV, Krenck R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH. 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26: 891–907.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63. DOI: org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Paradisi S, Sacchetti B, Balduzzi M, Gaudi S, Malchiodi-Albedi F. 2004. Astrocyte modulation of in vitro beta-amyloid neurotoxicity. *Glia* 46: 252–260.
- Pentreath VV, Mead C. 2004. Responses of cultured astrocytes, C6 glioma and 1321NI astrocytoma cells to amyloid beta-peptide fragments. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 2: 45–63.
- Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. 2006. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr. Neuropharmacol.* 4: 149–163.
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R. 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J. Neurochem.* 101: 794–805.
- Przedborski S, Vila M. 2003. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S. A.* 991: 189–198.
- Reale M, Kamal MA, Velluto L, Gambi D, Di Nicola M, Greig NH. 2012. Relationship between inflammatory mediators, Ab levels and ApoE genotype in Alzheimer disease. *Curr. Alzheimer Res.* 9: 447–457.
- Ren R, Zhang Y, Li B, Wu Y, Li B. 2011. Effect of b-amyloid (25-35) on mitochondrial function and expression of mitochondrial permeability transition pore proteins in rat hippocampal neurons. *J. Cell. Biochem.* 112: 1450–1457.
- Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. 2002. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40: 260–269.
- Sánchez NS, Konigsberg M. 2006. Using yeast to easily determine mitochondrial functionality with MTT assay. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 34: 209–212.
- Scheiber IF, Dringen R. 2012. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem. Int.* S0197: 284–287.
- Simonian NA, Coyle JT. 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 83–106.

- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7–35.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. 2004. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 72: 111–127.
- 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.
- Tsai MJ, Lee EH. 1994. Differences in the disposition and toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in cultured rat and mouse astrocytes. *Glia* 12: 329–335.
- Tsai MJ, Lee EH. 1998. Nitric oxide donors protect cultured rat astrocytes from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. *Free Radic. Biol. Medic.* 23: 705–713.
- Valles SL, Dolz-Gaiton P, Gambini J, Borrás C, Lloret A, Pallardo FV, Viña J. 2010. Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res.* 1312: 138–144.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 626–640.
- Wilson JX. 1997. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1149–1163.
- Wu EY, Langston JW, Di Monte DA. 1992. Toxicity of the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium and 1-methyl-4-phenylpyridinium species in primary cultures of mouse astrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 225–230.
- Yao HH, Ding JH, Zhou F, Wang F, Hu LF, Sun T, Hu G. 2005. Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes. *J. Neurochem.* 92: 948–961.
- Zentella de Piña M, Sandoval-Montiel A, Serrano-Alessandri L, Montalvo-Jave E, Zentella-Dehesa A, Piña E. 2007. Ethanol-mediated oxidative changes in blood lipids and proteins are reversed by aspirin-like drugs. *Arch. Med. Res.* 38: 269–275.
- Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS. 2010. Astroglialosis in CNS is there a role for microglia? *Mol. Neurobiol.* 41: 232–241.

Accepted Manuscript

Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pre-treatment

Adriana Alarcón-Aguilar, Armando Luna-López, José L. Ventura-Gallegos, Roberto Lazzarini, Sonia Galván-Arzate, Viridiana Y. González-Puertos, Julio Morán, Abel Santamaría, Mina Königsberg

PII: S0197-4580(14)00165-1

DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143)

Reference: NBA 8764

To appear in: *Neurobiology of Aging*

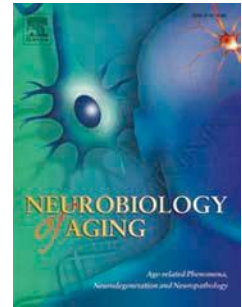
Received Date: 3 May 2013

Revised Date: 18 December 2013

Accepted Date: 30 January 2014

Please cite this article as: Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., Ventura-Gallegos, J.L., Lazzarini, R., Galván-Arzate, S., González-Puertos, V.Y., Morán, J., Santamaría, A., Königsberg, M., Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pre-treatment, *Neurobiology of Aging* (2014), doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.







INDUCCION DE RESPUESTA
ANTIOXIDANTE VIA Nrf2 FRENTE
A LA TOXICIDAD DE MPP+, EN
ASTROCITOS PROVENIENTES DE
RATAS DE DIFERENTES EDADES

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 25 del mes de febrero del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO
- DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
- DRA. SONIA GALVAN ARZATE
- DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE

ADRIANA ALARCON AGUILAR
ALUMNA


Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ADRIANA ALARCON AGUILAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar



REVISÓ
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

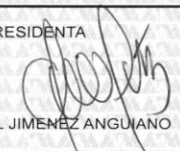
Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



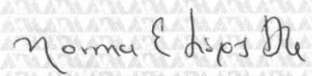
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA



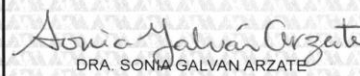
DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

VOCAL



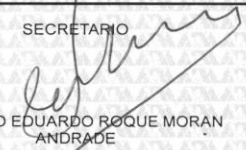
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL



DRA. SONIA GALVAN ARZATE

SECRETARIO



DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE

