

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**“PARTICIPACIÓN DE LA VÍA tBHQ/Nrf2 EN LA PROTECCIÓN DEL DAÑO  
OXIDANTE POR 3NP EN RATAS VIEJAS”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

**QFB ALEJANDRO SILVA PALACIOS**

**COMITÉ TUTORAL**

Co-Directores

**DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN**

**DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**

Asesor Externo

**DR. ARMANDO LUNA LÓPEZ**

Diciembre/2014

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 283838

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“PARTICIPACIÓN DE LA VÍA tBHQ/Nrf2 EN LA PROTECCIÓN DEL DAÑO OXIDANTE POR 3NP EN RATAS VIEJAS”**, que presentó el **QFB Alejandro Silva Palacios** el día 8 de Diciembre del año 2014.

### Sinodales

Presidenta

---

**Dra. Anabel Jiménez Anguiano**  
Departamento de Biología de la  
Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa

Vocal

---

**Dr. Armando Luna López**  
Laboratorio de Envejecimiento y Estrés  
Oxidante  
Instituto Nacional de Geriatria

Secretaria

---

**Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal**  
Departamento de Biomedicina  
Cardiovascular  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio  
Chávez”

Vocal

---

**Dra. Sonia Galván Arzate**  
Departamento de Neuroquímica  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
“Manuel Velasco Suarez”

# COMITÉ TUTORAL

## Co-Directora

### **Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Investigador Titular "C" de Tiempo Completo  
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa  
Departamento 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](mailto:mkf@xanum.uam.mx)

## Co-Director

### **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  
Laboratorio de Aminoácidos Excitadores  
Tel. (5255) 56063822 (Ext. 2013)  
E-mail: [absada@yahoo.com](mailto:absada@yahoo.com)

## Asesor Externo

### **Dr. Armando Luna-López**

Investigador en Ciencias Médicas "D"  
Instituto Nacional de Geriátrica  
Subdirección de Investigación Biomédica  
Laboratorio de Envejecimiento y Estrés Oxidante  
E-mail: [allbioexp@yahoo.com](mailto:allbioexp@yahoo.com)

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, a cargo de la Dra. Mina Königsberg Fainstein.

Así como en el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”, dirigido por el Dr. Abel Santamaría del Ángel.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Mina Königsberg** por brindarme la oportunidad y el espacio de formar parte de su grupo de trabajo (sobre todo el espacio, pues con el paso del tiempo el grupo de Bioenergética y Envejecimiento Celular crecería aún más, y aunque estuviéramos como auto-sardina siempre se trabajaba en grata compañía). Gracias por sus exigencias a nivel profesional pues de ello siempre obtuve lo mejor; gracias por el tiempo que siempre tuvo para atender mis dudas, sugerencias y pláticas. Gracias por los grandes momentos de risas, anécdotas, enseñanzas, por ser la gran docente y persona que la hacen única y especial. Una gran experiencia el aprender nuevos retos a nivel profesional y que mejor con excelentes investigadores. Gracias por siempre darme su apoyo incondicional y los buenos ánimos ante cualquier situación.

Agradezco al **Dr. Abel Santamaría** por sus charlas y comentarios que siempre fueron para mejorar a nivel profesional y personal, gracias por estar siempre al pendiente de mi trabajo experimental buscando la manera de salir adelante ante las adversidades. Le agradezco la oportunidad de haber formado parte de su grupo de trabajo, por haber conocido a la excelente persona que es tanto a nivel profesional como personal.

Gracias al **Dr. Armando Luna** por su apoyo y ayuda incondicional en todo momento, su gran riqueza a nivel de conocimientos lo hacen una persona única y de ello me llevo siempre lo mejor, por su vocación a nivel docencia y sobre todo a nivel experimental que siempre logro transmitir en mí el espíritu para mejorar en todo momento. Gracias por las ocurrencias, pláticas, risas, enojos, haciendo del laboratorio único en toda la extensión de la palabra.

Gracias a la **M. en C. Ana Laura Colín** por brindarme su apoyo y sus enseñanzas en este proyecto tuvo nuevas enseñanzas para mí, que al mismo tiempo significo un reto a nivel profesional. Por siempre aclarar mis dudas, por las charlas tan amenas y enriquecedoras y sin duda por los grandes momentos de risas.

Agradezco a la **Dra. Anabel Jiménez** por su infinito apoyo, sus pláticas tan amenas y de gran aprendizaje. Por sus comentarios en la escritura de mi tesis, agradezco la oportunidad de haberla tratado en el plano académico, profesional y personal, por su ayuda en todo momento y por siempre darme ánimos y desearme el mayor éxito ante los malos momentos por lo que pude haber atravesado.

Gracias a la **Dra. Ceci Zazueta** por los comentarios en mi tesis y especialmente por su apoyo e infinita confianza. Agradecido de sobremanera con usted por ser parte fundamental en mi vida académica, profesional y personal, por confiar en mí desde hace ya varios años, por ser quien me ha enseñado y fomentado la pasión a la investigación. Gracias por sus enseñanzas, por guiarme con su ejemplo de honestidad, sencillez y superación.

Agradecido con la **Dra. Sonia Galván** quien sin tener la oportunidad de conocerme se tomó el tiempo para la revisión de mi tesis, ayudando con ello a la obtención de este logro profesional. Gracias.

Gracias a todo el grupo de Bioenergética y Envejecimiento Celular: a **Norma, Viry, Ady, René, Luis, Stefy, Eli, Pedro, Alis, Rafa, Gibrán, Agla (Anglaé), Carlos, Sandra Caos, Sandra Li**, y los recién llegados: **Paola, Úla, Ismerai, Angélica y Verónica**; a todos gracias por los buenos momentos en el laboratorio haciendo de lo más agradable pasar el día entero con tanto trabajo, gracias por los días de seminarios que entre cumpleaños, día de muertos, navidad y por supuesto comidas, pasteles, gelatinas, y demás siempre fue grato disfrutar de su compañía y los buenos momentos de risas, no solo de ello, sino también de buenas discusiones, nuevos conocimientos y grandes aportes en cada uno de nuestros proyectos.

En especial a **Pao López**, quien me ayudo en todo momento, con la mayor disponibilidad en la obtención de las muestras y su procesamiento, por los fines de semana que tuvo que estar en el bioterio. Todo esfuerzo tiene su recompensa. Muchas gracias.

## DEDICATORIAS

Aunque sé que como en toda dedicatoria y agradecimiento siempre faltara alguien, tratare de recordar a cada uno de ustedes; siendo esta mi oportunidad de tomarme el espacio necesario para dedicarle este gran trabajo a mis seres más queridos.

Doy gracias a Dios por darme la oportunidad de continuar con mi preparación académica, gracias a mis tíos Ruth y Rosalio, mis dos ángeles que siempre están conmigo dándome su bendición y guiando mi camino les dedico mi esfuerzo y trabajo, sé que estarían contentos por el éxito obtenido.

Dedico con todo mi amor a mi mami la **Sra. María Silva Palacios** este proyecto de vida, quien en todo momento ha estado conmigo tanto en los buenos como en los malos momentos; pese a los grandes cambios que tuvimos en este último año he obtenido de ti (aunque enojada o no) palabras de aliento, felicitaciones y porque no decir regaños y jalones de orejas. Gracias por siempre ser mi fuente de superación, de esfuerzo, de lucha, de inspiración. Como siempre te lo he expresado, este triunfo es tuyo, pues todo el empeño, esfuerzo y cariño dado a lo que me apasiona es dedicado a ti. Doy gracias a Dios por darme la oportunidad de tenerte a mi lado y seguir cosechando grandes triunfos, sé que nos quedan muchos más por delante. Gracias por enseñarme los mejores valores, por hacer de mí una mejor persona, Mami lo hiciste bien... TE AMO!

A mi familia que siempre está conmigo, en especial a mis hermanos **Yes** y **David**; quienes entre risas y lágrimas y hasta en los enojos están conmigo, gracias por la convivencia y los gratos momentos hasta el día de hoy. A mi madrina la **Sra. Luz María Reyes**, de quien he recibido apoyo, consejos y gratos recuerdos dedicado con todo mi corazón y admiración para usted; por supuesto a mi prima **Vero Silva**, por las gratas horas de convivencia siempre llenas de risas y buenas anécdotas, por la fortaleza y esfuerzo que das día a día te admiro, gracias prima por todo; las adoro a ambas.

A ti por el tiempo dado hasta hoy en día, gracias por soportar mis momentos de frustración, lagrimas, enojos, estrés; no solo por ello, sino también por los momentos

de felicidad, alegría, diversión. Gracias por comprender la pasión que tengo por lo que hago, aunque ello implique no estar todo el tiempo contigo y brindarte momentos de calidad. Gracias por comprender las horas interminables que paso en la computadora realizando trabajos, estudiando, graficando, analizando, escribiendo... y ello implique no acompañarte a cenar o tomar café viendo *Drop dead diva*, *Dance moms*, *el Increíble Dr. Pool*, *Bring it*, todos esos programas que tanto nos agradan. Junto a ti comencé este nuevo proyecto de vida y a tu lado lo hemos culminado, así también estaremos por comenzar otro que sé nos traerá nuevos retos, grandes logros, lágrimas y risas. Te dedico con todo mi agradecimiento y amor este éxito en nuestras vidas.

A las grandes amigas que tuve la oportunidad de conocer, les dedico este éxito: Stefy, **Shei**, **Yadi**, **Anita** y Eli; gracias por los grandes y espectaculares momentos vividos a su lado, sé que se escuchara redundante y tal vez ya muy pronunciado, gracias por las lágrimas y risas, por las grandes charlas que tuvimos. En especial a mis queridas **Stefy y Eli**, quienes estuvieron conmigo en todo momento, desde muy temprano hasta muy tarde realizando experimentos en el laboratorio, tratando de presentar resultados en los tutorales. Por siempre andar corriendo de un lado a otro, por las buenas charlas y por las salidas para ir por un cafecito y que se nos pasara el tiempo de tan buena que estaba la “plática” (por no decir que en el chisme), gracias por los gratos momentos preparando pizza “saludable” o esas fantásticas piñas coladas, todos esos buenos momentos los guardo de manera especial en mi ser. Gracias por ser mi hombro cuando brotaban en mi alguna lágrima de enojo, tristeza o felicidad. Las amo y me llevo de ustedes lo mejor.

Dedico a mis amigos (que en realidad son como mi familia): **Chelis**, **Isra**, **Julio**, **Josué**, **Ale**, la pequeña **Abichuela**, y por supuesto a la muñe **Cris**, así como a **Betzy** y **Alo** por todo su apoyo incondicional en todo momento, por las buenas platicas, las gratas comidas llenas de carcajadas, por creer en mí y siempre brindarme bendiciones y las mejores de las vibras. Los llevo en mi pensamiento por todo lo bueno que han dejado en mí, los quiero mucho!!!

A mis hermanos de la licenciatura que pese a nuestras diversas actividades siempre estamos al pendiente de cada uno, por hacer el esfuerzo de vernos y brindar por nuestros éxitos: Gracias **Chino, Yessi, Pau, Tavo, Bere, Migue, Chivis, Mayu** y a nuestro papá **Nachito**... y por supuesto a los que me faltaron aunque ya ni se acuerden de nosotros también se las dedico.... Mi tesis no sean mal pensados!

A todos y cada uno de ustedes les dedico este triunfo, y porque no, también a aquellos que no creyeron ni creerán en mí; sus dudas, desplantes y todas esas actitudes “egocéntricas” me han fortalecido así que gracias, pues de manera indirecta me apoyaron.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>20</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>21</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>22</b>
1.1 El envejecimiento, el cerebro y el estrés oxidante .....	22
1.2 Estrés oxidante y su relación con las enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Huntington .....	25
1.3 Modelos para la enfermedad de Huntington: ácido 3-nitropropionico ...	30
1.4 Factor nuclear eritroide tipo 2: Nrf2 e inductores .....	34
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>38</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>42</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>43</b>
6.1 Objetivos particulares .....	43
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
7.1 Animales .....	44
7.2 Grupos experimentales .....	44
7.3 Aislamiento de proteínas.....	45
7.4 Cuantificación de proteína .....	46
7.5 Western blot .....	46
7.6 Derivatización de las proteínas oxidadas en cerebro .....	47
7.7 Evaluación de la conducta .....	48
7.8 Análisis histológico.....	48

7.9 Detección inmunohistoquímica de la proteína acídica fibrilar glial (gfap)	49
7.10 Medición de glutatión (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG) en cerebros.....	50
7.11 Análisis estadístico.....	50
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
8.1 Curva dosis respuesta de tBHQ durante la activación de Nrf2 en cerebro de ratas adultas.....	51
8.2 Curva dosis respuesta del efecto de 3NP sobre la activación de Nrf2 en cerebro de ratas adultas.....	52
8.3 Comparacion de los efectos del PreAc con tBHQ sobre Nrf2 en animales adultos y viejos expuestos a todos los tratamientos.....	54
8.5 Enzimas antioxidantes moduladas por Nrf2 en cerebros de ratas adultas y seniles tratados con tBHQ, 3NP y PreAc.....	56
8.8 Peso corporal de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del preac con tBHQ.....	59
8.9 Conducta de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ .....	61
8.10 Morfología del núcleo estriado y análisis cuantitativo del daño celular estriatal de ratas adultas y viejas despues de los tratamientos.....	64
8.11 Detección inmunohistoquímica y análisis cuantitativo de la proteína glial fibrilar acídica (GFAP) en tejido estriatal de ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.....	67
8.12 Cambios en el estado redox en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.....	71
8.13 Determinación de proteínas oxidadas en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.....	73
8.14 Determinación de la proteína PGC1- $\alpha$ en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ .....	74

8.15 Determinación del factor de transcripción NFκB en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.....	75
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>90</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>94</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>95</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Marcadores del envejecimiento.	25
<b>Figura 2.</b> Localización del gen de la EH.	27
<b>Figura 3.</b> Ubicación de los ganglios basales (GB).	27
<b>Figura 4.</b> Tamaño de las repeticiones de CAG y severidad de la EH	28
<b>Figura 5.</b> Cadena respiratoria mitocondrial.	29
<b>Figura 6.</b> Estructura químicas de los agentes neurotóxicos utilizados para lesión excitotóxica para la EH.	31
<b>Figura 7.</b> Estructura química del 3NP, el cual imita al sustrato ácido succínico.	32
<b>Figura 8.</b> Inhibición irreversible de la SDH por el 3NP	33
<b>Figura 9.</b> Mecanismo intracelular de la degeneración de neuronas estriatales inducidas por 3NP.	34
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de activación del factor de transcripción Nrf2	36
<b>Figura 11.</b> Estructura química del tert-butilhidroquinona (tBHQ)	36
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de tBHQ	37
<b>Figura 13.</b> Esquema de administración para los grupos experimentales	45
<b>Figura 14.</b> Curva dosis respuesta de tBHQ durante la activación de Nrf2, en ratas adultas (9m).	52
<b>Figura 15.</b> Curva dosis respuesta de 3NP durante la activación de Nrf2, en ratas adultas (9 m).	54
<b>Figura 16.</b> Translocación nuclear de Nrf2 en ratas adultas (9m) y viejas (24 m) después de los tratamientos con tBHQ, 3NP y PreAc.	55

<b>Figura 17.</b> Comparación de las enzimas antioxidantes moduladas por Nrf2 en todos los tratamientos en animales adultos y viejos.	58
<b>Figura 18.</b> Registro del peso corporal de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.	60
<b>Figura 19.</b> Registro de la conducta de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.	63
<b>Figura 20.</b> Citoarquitectura del núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.	66
<b>Figura 21.</b> Análisis cuantitativo del daño observado en el núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.	67
<b>Figura 22.</b> Inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.	70
<b>Figura 23.</b> Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.	71
<b>Figura 24.</b> Cambios en el estado redox en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ	72
<b>Figura 25.</b> Determinación de proteínas oxidadas en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.	73
<b>Figura 26.</b> Determinación de la proteína PGC1- $\alpha$ en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.	75
<b>Figura 27.</b> Determinación del factor de transcripción NF $\kappa$ B en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.	76
<b>Figura 28.</b> Mecanismos propuestos en la activación de Nrf2 en el modelo de PreAc con tBHQ.	93

## ABREVIATURAS

3NP	Ácido 3-nitropropionico
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -glutamylcisteínsintetasa
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AI	Ácido iboténico
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ATP	Adenosin trifosfato
BHA	3-tert-butilhidroxianizol
BSA	Albumina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAG	Trinucléotido Citosina-Adenina-Guanina
CAT	Catalasa
C DR	Curva dosis-respuesta
CK	Ciclo de Krebs
Cit c	Citocromo c
Ct	Control
CTE	Cadena de transporte de electrones
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DNP	Dinitrofenilhidrazona
DO	Daño oxidante
DTR	Distancia total recorrida
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EN	Estrés nitrosante
EO	Estrés oxidante
EP	Enfermedad de Parkinson
EpRE	Elemento de respuesta a electrófilos
ERO	Especies reactivas de oxígeno

ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FC	Fracción citosólica
FN	Fracción nuclear
FOSOX	Fosforilación oxidativa
GB	Ganglios basales
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
GPx	Glutación peroxidasa
GSH/GSSG	Glutación reducido/Glutación disulfido
GST	Glutación S-transferasa
HO-1	Hemo-oxigenasa-1
HRP	Peroxidasa de rábano
Htt	Gen Huntingtina
IT15	Transcrito 15
KA	Ácido kainico
MA	Malonato
MH	Movimientos horizontales
mHtt	Proteína Huntingtina mutada
MV	Movimientos verticales
Na <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Citrato de sodio
NQO1	NADPHquinonaoxidoreductasa-1
nNOS/NOS-1	Oxido nítrico neural/sintasa de óxido nítrico tipo 1
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
ON	Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Radical peroxinitrito
P	Fosforilación
PC	Peso corporal
PKC	Proteína Cinasa C
PreAc	Pre-acondicionamiento
PreT	Pre-tratamiento
PVDF	Difluoruro de polivinilideno

Q	Ubiquinona
QA/QUIN	Ácido quinolínico
RL	Radicales libres
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SODCu/Zn	Superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
tBHQ	tert-butilhidroquinona
tBQ	tert-butilbenzoquinona
WB	Western blot

*La vida no es fácil, para ninguno de nosotros.  
Pero... ¡Que importa! Hay que perseverar y, sobre todo,  
tener confianza en uno mismo.*

*Marie Curie*

*No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive,  
sino el más capaz de adaptarse a los cambios.*

*Charles Darwin*

## RESUMEN

El envejecimiento puede definirse como un fenómeno multifactorial que involucra a los diferentes niveles de organización biológica, conduciendo paulatinamente a la fragilidad y la disfunción en la edad avanzada, que eventualmente se manifiesta en el desarrollo de numerosas patologías, culminando en la muerte. El cerebro es un órgano muy susceptible al daño por estrés debido a su gran demanda oxigénica y baja capacidad antioxidante generando enfermedades neurodegenerativas. Nrf2 es un factor de transcripción que se activa para contrarrestar el daño por estrés oxidante, y existen diversos inductores químicos que promueven su translocación nuclear. Entre ellos destaca el tert-butilhidroquinona (tBHQ), que protege a los animales y células de agentes tóxicos. Por lo que la interrogante se basa en esclarecer si los animales seniles serán capaces de inducir la respuesta antioxidante vía Nrf2 y obtener protección contra el daño producido por el neurotóxico ácido 3-nitropropionico (3NP). Para ello se estudiaron ratas Wistar adultas (9 m) y viejas (24 m). Se cuantificó la translocación de Nrf2, las enzimas antioxidantes SOD, HO-1, y GST; el cociente GSH/GSSG y la carbonilación de proteínas. Se realizó una prueba de motricidad para evaluar comportamiento, seguido del análisis histológico de la región caudado-putamen y gliosis reactiva. Los resultados indican que los animales viejos se encontraban más dañados que los adultos, pero que el pre-tratamiento con tBHQ logró protegerlos de daño por 3NP.

## **ABSTRACT**

Aging is a multifactorial phenomenon that involves the different levels of biological organization, leading to the old age frailty and dysfunction, which eventually culminates in pathologies and death. The brain is a very susceptible tissue due to its high oxygenic need and low antioxidant capacity generating neurodegenerative diseases.

Nrf2 is a transcription factor that activates to counteract oxidative stress; there are different chemical inductors that promote its activation. One important inductor is tert-butylhydroquinone (tBHQ) that protects animals and cells against toxic agents.

The aim of this work was to evaluate if old animals are capable to induce the antioxidant response via Nrf2 and get protection against the damage produced by the neurotoxic 3-nitropropionoc acid (3NP). Adult (9m) old (24m) Wistar rats were studied. Nrf2 translocation, antioxidant enzymes SOD, HO-1 and GST, as well as GSH/GSSG and protein carbonilation were determined. Along with motility and histological studies were performed.

Our results showed that old animals were more damaged than adult ones, but tBHQ pre-treatment managed to protect them from oxidative damage and reactive gliosis.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL ENVEJECIMIENTO, EL CEREBRO Y EL ESTRÉS OXIDANTE

El envejecimiento es un proceso que experimenta todo ser vivo con el paso del tiempo y ha sido objeto de amplio estudio. Este proceso ha sido definido desde diferentes puntos de vista; sin embargo, puede decirse que el envejecimiento es un fenómeno multifactorial que involucra a los diferentes niveles de organización biológica (genes, células, tejidos, sistemas y el organismo como una unidad funcional). Este proceso conduce paulatinamente a la fragilidad y la disfunción en la edad avanzada, que eventualmente se manifiesta en el desarrollo de numerosas patologías degenerativas y culmina con la muerte (Harman, 1981; Pardo-Andreu, 2003; Domínguez-Gerpe, 2008; Pérez, 2009; López-Muñoz, 2012; López-Otín, 2013).

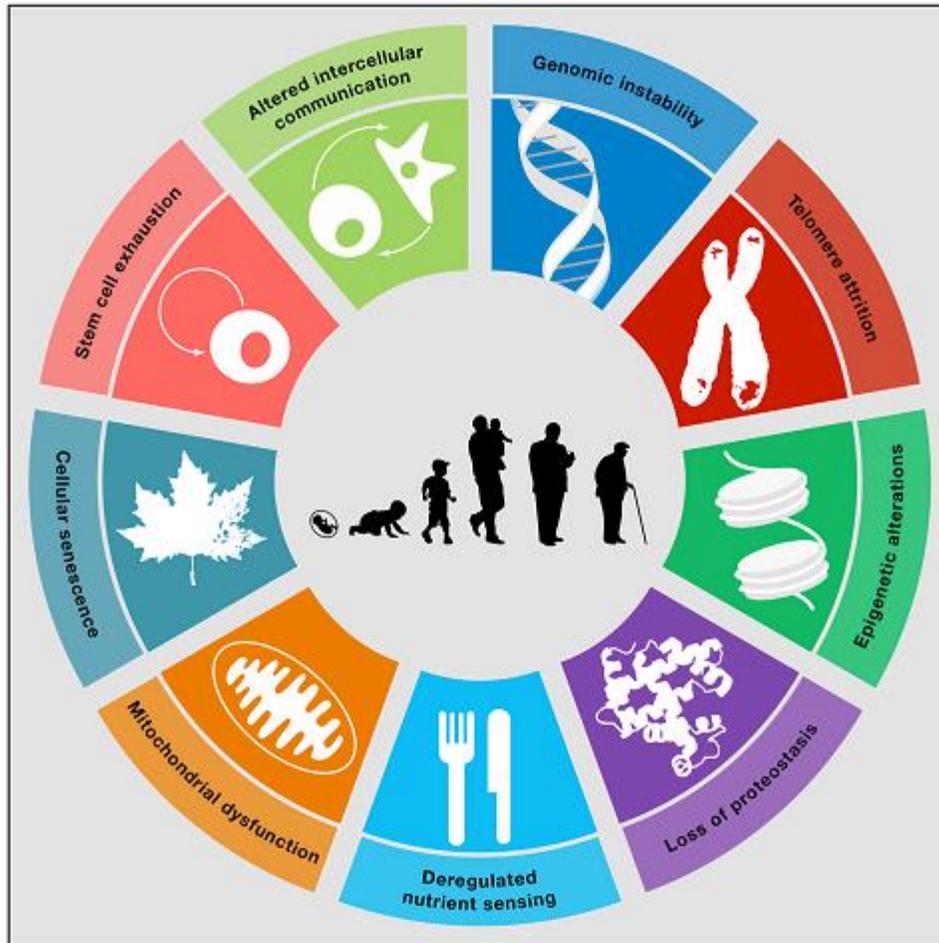
Se ha sugerido que los efectos del envejecimiento son una combinación de procesos genéticamente programados y alteraciones genéticas y epigenéticas inducidas por factores endógenos y exógenos, que tienen lugar a nivel celular (Kirkwood, 1992; Wodja, 2003; Funayama, 2007; Hwang, 2009; Tollesbol, 2009). En este sentido, la naturaleza del envejecimiento vista desde su genética y genómica, es discutida por Wheeler, definiéndola en primera instancia como un proceso natural, gradual, progresivo e irreversible por el cual el organismo completo se deteriora y que, en muchos casos, conlleva a situaciones patológicas que afectan la calidad de vida; además caracterizado por la disminución de múltiples funciones fisiológicas que conllevan a una probabilidad creciente de muerte (Harman, 1956; Wheeler y Kim, 2011; Venkataraman, 2013).

El envejecimiento se ha definido atendiendo a los siguientes puntos: (1) progresivo, (2) endógeno, (3) universal y (4) deletéreo; en todos los casos se observa la pérdida progresiva de la integridad fisiológica así como daño en la función e incremento en la vulnerabilidad a eventos deletéreos. Además, uno de los principales problemas del envejecimiento humano es que dicho deterioro es el factor de riesgo primario para el desarrollo de diversas patologías, incluyendo cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, se ha propuesto al estrés oxidante (EO) como una de las causas primarias que vinculan al proceso de envejecimiento con el establecimiento de una gran cantidad de patologías. Ello debido a las alteraciones estructurales y funcionales producidas directamente por las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO/ERN, respectivamente), así como por la muerte celular (necrosis o apoptosis) que pueden inducir (Friedlander, 2003). El EO se define como la perturbación en el balance de los radicales libres (RL), o bien ERO/ERN, en una célula y la capacidad de ésta para hacer frente a los cambios por medio de sus defensas antioxidantes (Venkataraman, 2013).

El sistema nervioso (SN) es particularmente vulnerable a los efectos deletéreos de las ERO/ERN, y se vuelve más susceptibles conforme avanza la edad. Ello debido a que el cerebro presenta altas concentraciones de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) que son altamente susceptibles a la lipoperoxidación; así mismo, el SN es un tejido que requiere altas cantidades de oxígeno ( $O_2$ ) para producir energía, y por tanto posee un alto contenido de mitocondrias y genera una gran cantidad de ERO/ERN, en particular moléculas

como el óxido nítrico (NO). Aunado a ello, este tejido presenta un deficiente sistema antioxidante con bajos niveles de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), en comparación a otros órganos (Kedar, 2003; Polidori, 2003). De esta manera, la alta tasa metabólica y la baja capacidad regenerativa del cerebro, hacen que sea muy susceptible al EO y estrés nitrosante (EN). Nueve marcadores que representan un común denominador del envejecimiento en diferentes organismos se presentan en la *Figura 1*, siendo la disfunción mitocondrial la que tiene la mayor relevancia en la presente investigación.

Es bien sabido que la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (CTE) tiende a disminuir en las células y los organismos con la edad, incrementando la generación de ERO/ERN y reduciendo la generación de adenosina trifosfato (ATP) (Harman, 1998; Shukitt-Hale, 2003). Por todo lo anterior es claro que durante el envejecimiento normal, el cerebro sufre modificaciones morfológicas y funcionales afectando sinapsis y terminales dendríticas, neurotransmisión, circulación y metabolismo que son reflejados en la alteración de sistema motor y sensorial, sueño, memoria y aprendizaje (Timiras, 2003).



**Figura 1. Marcadores del envejecimiento.** El esquema enumera los 9 marcadores del envejecimiento: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación de nutrientes, **disfunción mitocondrial**, senescencia celular, agotamiento metabólico de células y comunicación intercelular alterada (López-Otín, 2013).

## 1.2 ESTRÉS OXIDANTE Y SU RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Los desórdenes neurodegenerativos son enfermedades progresivas, capaces de disminuir las funciones del cerebro y dependientes de la edad, caracterizados por daño en las funciones cognitivas, motoras, coordinación, movimientos discinéticos y cambios irreversibles en comportamiento y personalidad (Chaturvedi y Beal, 2013).

Algunos de estos desordenes incluyen a la enfermedad de Parkinson (EP), la

enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH).

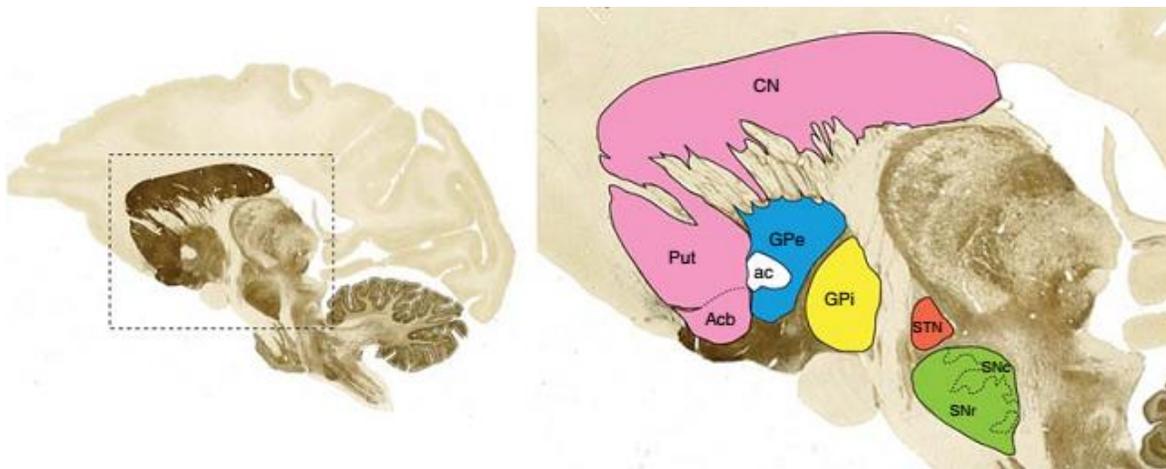
La EH es un desorden neurodegenerativo progresivo y fatal. Clínicamente está caracterizado por daño cognitivo, psiquiátrico y motor, así también presenta un fenotipo que incluye pérdida de peso y masa muscular (Walker, 2007); los pacientes muestran movimientos anormales “tipo-danza” llamados corea y distonia, también caracterizada por pérdida progresiva de las neuronas espinales medianas GABAérgicas del estriado (Gubellini, 2010); la razón por la cual solo hay pérdida selectiva de este tipo de neuronas y la etiología de la enfermedad aún no ha sido completamente estudiada.

La EH es una enfermedad hereditaria autosómica dominante debido a la mutación en el gen de la huntingtina (Htt) que es causada por una expansión repetida del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG), que codifica para el aminoácido no esencial glutamina (Beal y Ferrante 2004; Pouladi, 2013), en la región codificante de una proteína de aproximadamente 350 Kb (THDCRG, 1993) en el exón 1 de la Htt (Pouladi, 2013); también conocido como transcrito 15 (IT15) (THDCRG, 1993), localizado en la región 16.3 en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3, *Figura 2*) (Túnez, 2010). La Htt es universalmente expresada en neuronas a lo largo del cerebro (Beal y Ferrante, 2004), sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), y su forma mutada afecta a los ganglios basales (GB) (Túnez, 2010).



**Figura 2.** La imagen muestra la localización del gen de la EH en la banda 4p16.3 del cromosoma 4 (Tomado de Reiner, 2011).

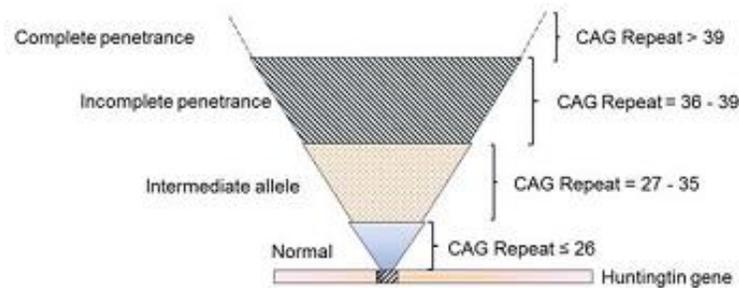
Los GB son un grupo interconectado de núcleos cerebrales comunicados con elementos sensoriales, motores, cognitivos y motivacionales (Figura 3). En particular, los GB juegan un rol importante en la regulación de movimientos voluntarios, así como en aprendizaje y memoria (Wise, 2004).



**Figura 3. Ubicación de los ganglios basales (GB).** La imagen muestra una sección parasagital de un cerebro de mono (teñido con acetilcolinesterasa) que muestra la localización de la mayoría de los componentes del sistema de los GB. Los **núcleos de entrada** cuya función es recibir información de diferentes fuentes: cortical, tálamica y nigral, constituidos por núcleo caudado (CN), putamen (Put), núcleo Accumbens (Acb); los **núcleos de salida** que son estructuras que envían información de los GB al tálamo, formados por: globo pálido interno (GPi) y sustancia nigra pars reticulada (SNr) y los **núcleos intrínsecos** localizados entre los núcleos de entrada y salida, que actúan liberando la información, conformados por: globo pálido externo (GPe), núcleo subtálamico (STN) y sustancia nigra pars compacta (Snc) (Tomado de Lanciego, 2012)

El número de tripletes expresados por el gen que codifica para la Htt determina la severidad, la edad de inicio y la probabilidad de transmisión a los descendientes

(Figura 4). Los síntomas aparecen y se desarrollan durante el curso y evolución de la enfermedad. Aunque varios cambios bioquímicos, moleculares, fisiológicos y anatómicos en la EH han sido extensamente descritos, estos aún no han sido totalmente establecidos y clarificados. Además, aún es incierto si el EO es el evento primario de iniciación asociado con la neurodegeneración o un efecto secundario relacionado a otras vías patológicas.

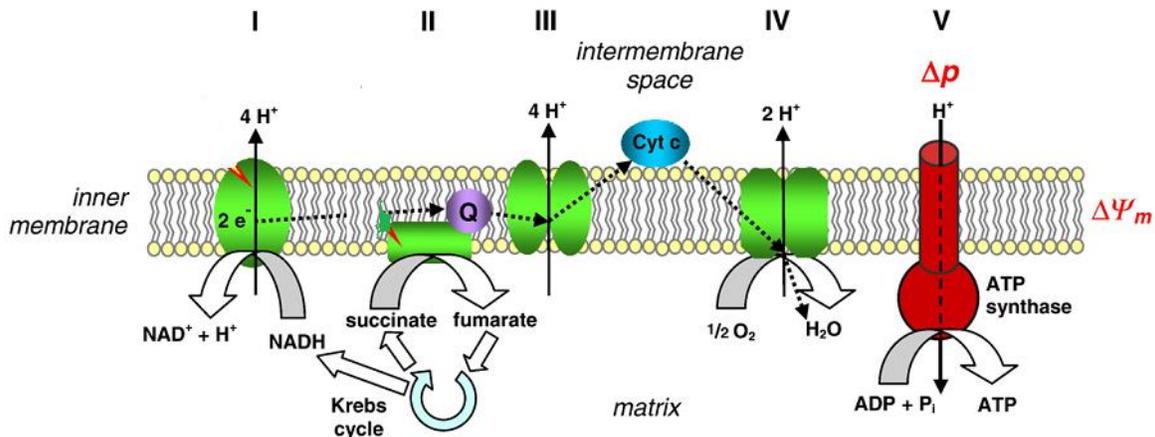


**Figura 4.** Tamaño de las repeticiones de CAG y severidad de la EH (Tomado de Chandra, 2014).

Diferentes estudios bioquímicos han determinado que el mayor defecto en el metabolismo energético de los pacientes con esta neuropatía está caracterizado por la disfunción mitocondrial (Figura 5); sin dejar de lado los procesos inflamatorios, daño por excitotoxicidad y daño a nivel transcripcional que han sido identificados como factores causales para el desarrollo, no solo de la EH, sino también de otros desordenes neurodegenerativos.

Las mitocondrias del cerebro podrían conducir a una deficiencia severa en la generación de energía así como un incremento en la producción de ERO y culminar en la muerte neuronal (Chaturvedi, 2013).

Las mitocondrias de los pacientes con Huntington presentan alteraciones en la función de la CTE, en particular los complejos II y III, propiciando una disminución significativa en la oxidación del succinato y en la síntesis de ATP, aunada a un aumento en la generación de ERO (Túnez, 2010).



**Figura 5. Cadena respiratoria mitocondrial.** Los complejos I a IV de la CTE que catalizan la FOSOX están en verde. Los  $e^-$  donados durante la reducción de ubiquinona (Q) por NADH son transportados a través de los complejos I, III y citocromo c (cit c) al complejo IV, quien los transfiere al  $O_2$  para generar agua. Durante este proceso 10 protones ( $H^+$ ) por cada  $2e^-$  son bombeados de la matriz al espacio intermembranal por los complejos I, III y IV, generando un gradiente de  $H^+$  ( $\Delta p$ ) que cruza la membrana interna, contribuyendo al potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Este gradiente es utilizado por la ATPsintasa (en rojo), también llamada complejo V, para la síntesis de ATP a partir de ADP y  $P_i$ . Las toxinas utilizadas en modelos experimentales de las enfermedades de GB tienen como blancos el complejo I y II (Tomado de Gubellini, 2010).

La producción de ERO se ha asociado a la excitotoxicidad promoviendo la liberación masiva de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) de la mitocondria y del retículo endoplásmico al citoplasma, activando a la sintasa de óxido nítrico neural (nNOS, también llamada óxido nítrico sintasa tipo I (NOS-I), por sus siglas en inglés, con la subsecuente producción de NO. Después, el NO reacciona con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) de la CTE generando al peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

Estos eventos crean un desbalance entre el sistema oxidante/antioxidante caracterizado por la producción excesiva de ERO y la reducción en el sistema antioxidante, promoviendo un estado de EO (Túnez, 2010); este fenómeno está asociado con daño celular y muerte neuronal (Vonsattel, 1985; DiFligia, 1997; Eskenazi, 2007).

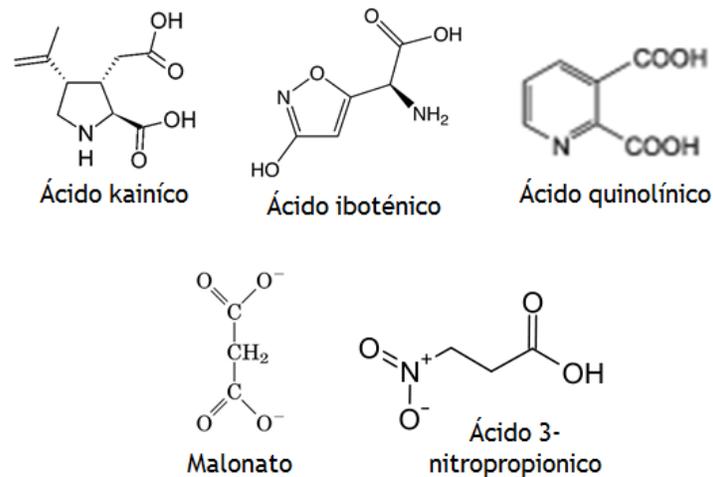
Por todo lo anterior, es importante generar modelos que mimeticen el fenotipo de la EH, así como los mecanismos bioquímicos-moleculares y cambios celulares que lo induzcan para lograr comprender esta neuropatía, y con ello brindar estrategias terapéuticas que ayuden a disminuir los síntomas y proporcionar una mejor calidad de vida a los pacientes.

### **1.3 MODELOS PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: ÁCIDO 3-NITROPROPIONICO**

Por muchos años, los modelos de la EH se generaban mediante la lesión estriatal de los animales, haciendo uso de neurotoxinas (Pouladi, 2013). Puesto que el sitio primario de neurodegeneración es el estriado, las inyecciones intraestriatales de agonistas del receptor de glutamato tenían como resultado la pérdida selectiva de neuronas GABAérgicas. Los primeros modelos neurotóxicos empleaban el ácido iboténico (AI) y el ácido kaínico (KA); posteriormente estos compuestos fueron suplantados por ácido quinolínico (QA) (*Figura 6*).

Además de los agonistas de glutamato, la administración periférica de toxinas mitocondriales como malonato (MA) y ácido 3-nitropropionico (3NP) (*Figura 6*) son usados para generar el modelo de lesión de la neuropatía (Pouladi, 2013). A grandes

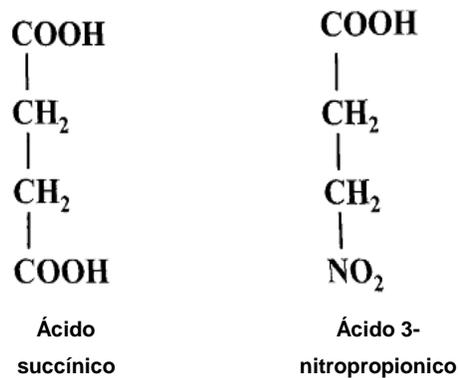
rasgos, estas toxinas causan disminución de energía celular, y un tratamiento crónico resulta en la formación espontánea de lesiones bilaterales, predominantemente en el cuerpo estriado. El objetivo del uso de estos modelos es obtener candidatos terapéuticos y nuevos enfoques para la terapia (Ross y Tabrizi, 2011).



**Figura 6.** Estructura químicas de los agentes neurotóxicos utilizados para lesión excitotóxica para la EH.

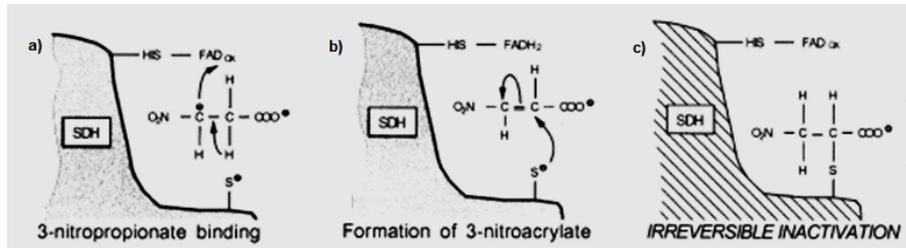
El particular, el modelo de 3NP es un buen modelo “fenotípico” de la EH, ya que aunque no está directamente asociado a la expresión de la proteína Htt mutada (mHtt), este modelo puede mimetizar y reproducir los síntomas hiperkinéticos e hipocinéticos, dependiendo del tiempo y dosis administrada. De acuerdo a Borlongan y colaboradores, los cambios de comportamiento observados en animales a los cuales se les ha administrado 3NP podrían resumirse en tres fases: (a) etapa de somnolencia, (b) marcha descoordinada y (c) decúbito ventral y lateral (Borlongan, 1997a).

El 3NP inhibe a la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) mitocondrial, la cual está activa en el CK y en la CTE durante la síntesis de ATP (Alexi, 1998). El 3NP estructuralmente reemplaza el sustrato de la SDH (el ácido succínico, *Figura 7*); la forma dianión del 3NP se une a la SDH, llevando a cabo la formación del nitroacrilato, el cual reacciona con un grupo tilo esencial de la SDH y permanece covalentemente unido a la enzima, bloqueando irreversiblemente su actividad (Alexi, 1998; Brouillet, 1999) (*Figura 8*); este efecto se produce en núcleo estriado de manera preferente a otras regiones del cerebro.



**Figura 7.** Estructura química del 3NP, el cual imita al sustrato ácido succínico.

El 3NP no únicamente involucra excitotoxicidad, también está relacionado con la generación de EO. Algunos de los eventos y factores relacionados con la degeneración estriatal llevada a cabo por 3NP se resumen en la *Figura 9*.



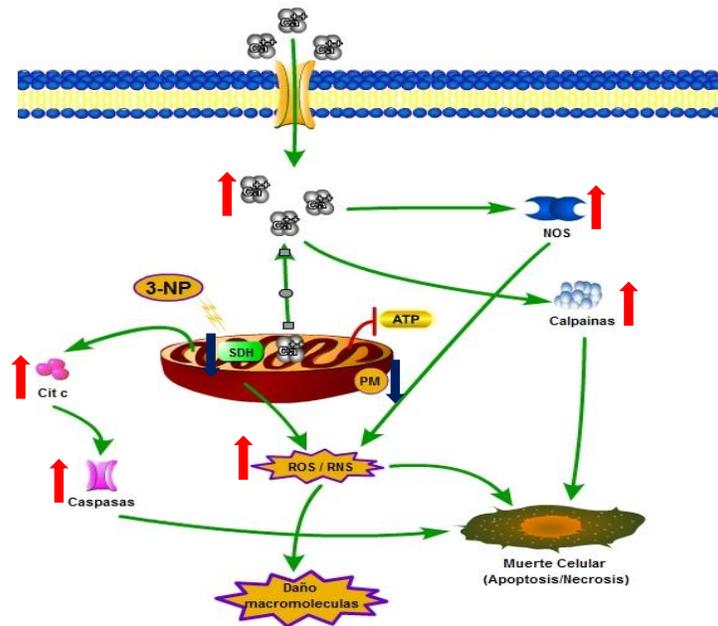
**Figura 8.** Inhibición irreversible de la SDH por el 3NP (Tomado de Alexi, 1998)

Brevemente, (en modelos *in vitro* e *in vivo*) el 3NP inhibe el sitio catalítico de la SDH, bloqueando a la CTE y el CK, produciendo una disminución en el  $\Delta\Psi_m$  y la síntesis de ATP. Así mismo, el 3NP induce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que activa enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo la NOS, la cual permite un incremento de ERN; aunado a ello, la perturbación mitocondrial inducida por 3NP está asociada con la producción masiva de ERO. Además, la activación de calpaínas produce el rompimiento de una gran cantidad de proteínas (Brouillet, 2005), todo lo cual produce daños irreversibles y eventualmente, la muerte celular.

La neurodegeneración involucra procesos inflamatorios agudos, ya que la aplicación *in vitro* de 3NP también se ha relacionado con la activación de NF $\kappa$ B (Napolitano, 2008); asociado a ello, la intoxicación con esta micotoxina incrementa el EO induciendo la pérdida neuronal estriatal. Se sabe que algunos agentes que generan ERO/ERN de manera controlada pueden activar a Nrf2 u otros mecanismos que intenten prevenir, proteger y recuperar a los tejidos del insulto inducido por 3NP (Cho, 2002; Lee, 2003; Gao y Talalay, 2004).

El 3NP induce degeneración del caudado-putamen (núcleo estriado) (De Oca Balderas, 2013), causando degeneración en las neuronas espinosas medianas

GABAérgicas en el estriado (Beal, 1993), pero también induce lesiones cerebrales en otras áreas localizadas en el hipocampo, tálamo y corteza cerebral (Borlongan, 1997a); estas lesiones están acompañadas de gliosis moderada, disminución en la actividad de la citocromo oxidasa, y una preservación relativa de interneuronas positivas a NADPH diaforasa y aferentes estriatales dopaminérgicas (Bossi, 1993).



**Figura 9.** Mecanismo intracelular de la degeneración de neuronas estriatales inducidas por 3NP.

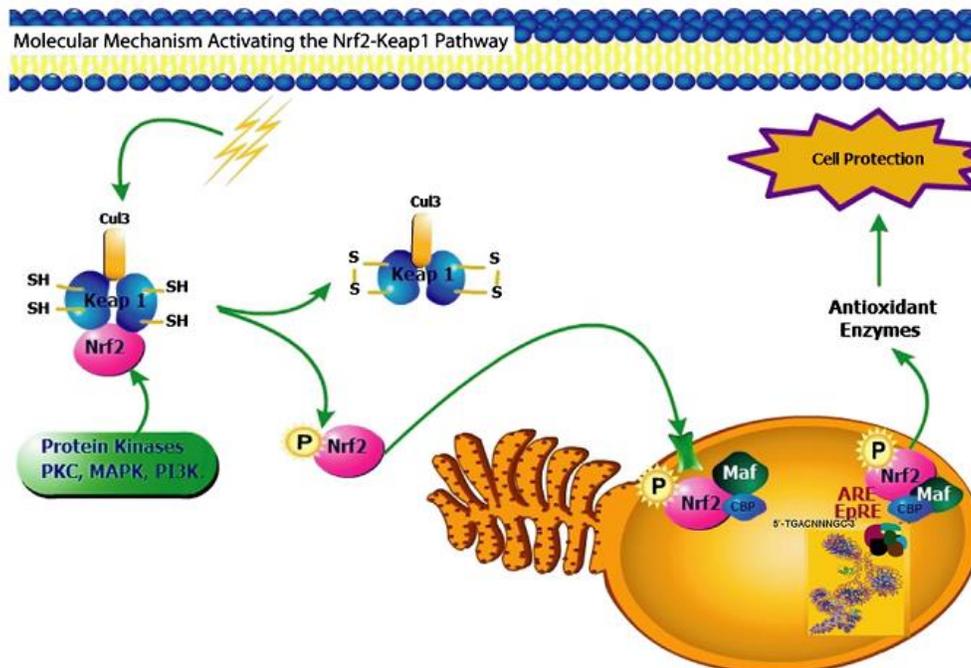
#### 1.4 FACTOR NUCLEAR ERITROIDE TIPO 2: Nrf2 E INDUCTORES

Los antioxidantes celulares son cruciales para reducir el EO y prevenir la muerte neuronal (Sato, 2006). Recientemente se han elucidado rutas que inducen la activación transcripcional que involucra enzimas antioxidantes y/o a través de las modificaciones en el estado redox que puedan modular la actividad de estos factores de transcripción, como por ejemplo NFκB, AP1 y Nrf2 (Forman, 2004; Jones, 2008).

Nrf2 es el factor nuclear eritroide-2 (Luna-López, 2010), un potente activador transcripcional que participa en la inducción coordinada de genes para proteínas de fase II, a través de la activación del elemento de respuesta antioxidante/elemento de respuesta a electrófilos (ARE/EpRE) (Jaiswal, 2004). ARE es un elemento esencial que actúa en *cis*, para la activación transcripcional de genes de fase II, incluyendo enzimas como hemo-oxigenasa-1 (HO-1), NADPH-quinonaoxidoreductasa-1 (NQO1) y  $\gamma$ -glutamilcisteíniligasa ( $\gamma$ -GCL); estas enzimas proveen citoprotección eficiente, en parte, regulando el estado redox intracelular (Gong, 2002; Itoh, 2004). Cabe mencionar que este tipo de proteínas reducen la electrofilicidad de los metabolitos carcinógenos y xenobioticos mediante su conjugación enzimática con ligandos endógenos, por ejemplo, glutatión (GSH) (Königsberg, 2008), y así protegen a las células contra el daño generado por el EO/EN (Itoh, 1997). Aunque, HO-1 no es una enzima de fase II, ha tomado especial atención debido a sus efectos terapéuticos contra las enfermedades neurodegenerativas (Satoh, 2006).

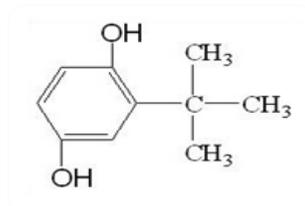
Bajo condiciones normales, Nrf2 es secuestrado en el citoplasma por su proteína represora Keap1 (Itoh, 1999), y degradado vía proteosoma. En respuesta a los activadores/inductores de Nrf2 que cambian el estado redox, varias de las cisteínas que conforman a Keap1 se oxidan, lo cual inhibe la ubiquitinación de Nrf2, resultando en la estabilización de Nrf2 y permitiendo su fosforilación. Posteriormente el factor se transloca al núcleo, en donde forma un heterodímero con proteínas pequeñas Maf (McMahon, 2006; Tong, 2007; Zhao, 2009). El heterodímero Nrf2-Maf se

une a ARE/EpRE para activar la transcripción de genes blanco para protección celular (*Figura 10*, (Koh, 2009; Buelna-Chontal y Zazueta, 2013)).



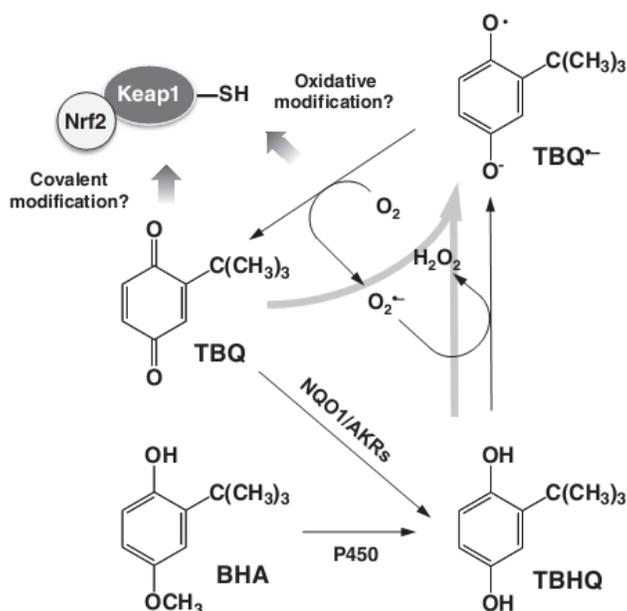
**Figura 10.** Mecanismo de activación del factor de transcripción Nrf2 (Tomado de Buelna-Chontal y Zazueta, 2013).

Entre los inductores de Nrf2 más estudiados se encuentra la tert-butilhidroquinona (tBHQ) (*Figura 11*), un compuesto fenólico derivado del 3-tert-butilhidroxianisol (BHA); el cual además de poseer propiedades antioxidantes, ha sido ampliamente usado como conservador en alimentos (Nishizono, 2000; Koh, 2009).



**Figura 11.** Estructura química del tert-butilhidroquinona (tBHQ)

Se ha documentado que tBHQ protege animales y líneas celulares contra el daño tóxico e insulto oxidante debido a que induce la activación transcripcional de Nrf2, incrementando la estabilidad de la proteína (Gharavi, 2007; Tasset, 2010). Además, tBHQ protege contra la radiación y daño por toxicidad de varios xenobióticos (Ahmed, 1996). Sin embargo, tBHQ debe metabolizarse para activar a Nrf2 (auto-oxidación); es decir, su producto de oxidación, tert-butilbenzoquinona (tBQ), es el inductor de este efecto, debido a sus propiedades electrofílicas, además de estar asociado con la generación de ERO (Wang, 2010; Abiko, 2011) (Figura 12). Sin embargo, las contribuciones relativas del EO y la modificación covalente de tBQ derivadas de tBHQ por la activación de Nrf2 no han sido bien entendidas.



**Figura 12.** Mecanismo de tBHQ (Tomado de Abiko, 2011)

## 2. ANTECEDENTES

Varios estudios han demostrado que el uso del inductor tBHQ, además de poseer propiedades antioxidantes, tiene la capacidad de promover la translocación nuclear del factor de transcripción Nrf2 *in vitro* (Tasset, 2010; Patel, 2012). En respuesta a EO, el factor de transcripción Nrf2 se transloca del citoplasma al núcleo, permitiendo la expresión de genes con actividad antioxidante, como glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD) y HO-1, entre otros (Zhao, 2009; Durante, 2010; Colín-González, 2013).

En un estudio se utilizó el modelo animal *in vivo* de la EH con el objetivo de investigar si la toxicidad del 3NP puede ser atenuada por la actividad inducible (mediante tBHQ) o constitutiva de Nrf2, observándose que tBHQ disminuye el daño producido por 3NP en ratones Nrf2<sup>+/-</sup>, pero no en Nrf2<sup>-/-</sup>, confirmando la acción específica del inductor de Nrf2 *in vivo*. Por otro lado, en cultivo de astrocitos, el 3NP incrementó la actividad de Nrf2, permitiendo la expresión de genes dependientes de ARE, proporcionando un mecanismo potencial para la sensibilidad de animales Nrf2<sup>-/-</sup> a la toxicidad por 3NP *in vivo* en un modelo de animales jóvenes (Shih, 2005); sin embargo, el papel de tBHQ/Nrf2 y 3NP en modelos de animales viejos aún no ha sido esclarecido. Por otro lado, en datos publicados por nuestro grupo de trabajo se utilizaron astrocitos como modelo de estudio, los cuales fueron tratados con diversos agentes neurotóxicos para inducir efectos diferenciales en astrocitos obtenidos de ratas neonatas, adultas y viejas, teniendo especial énfasis en eventos vinculados con EO como fuente potencial de daño. Los resultados demostraron que

hay una disminución en la viabilidad celular, así como una disminución en la función mitocondrial en ambos grupos; en lo que respecta al daño oxidante, los astrocitos tratados con el mismo agente neurotóxico sufrieron mayor daño en el grupo de células provenientes de ratas viejas. Bajo estas mismas condiciones se observó que hay una participación activa de Nrf2 en los astrocitos de animales viejos al activarse los genes de enzimas antioxidantes como GST y  $\gamma$ -GCS, modulados por Nrf2 (Alarcón-Aguilar, 2014). En este sentido, datos más recientes de nuestro grupo de trabajo mostraron que aquellos astrocitos provenientes de ratas viejas son más susceptibles a la toxicidad de un agente oxidante que los astrocitos de ratas neonatas. Al ser pre-tratadas con tBHQ, los astrocitos de ratas viejas activaron a Nrf2 de manera significativa, incrementando a GST y  $\gamma$ -GCS para desarrollar protección celular (Alarcón-Aguilar, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cerebro es un órgano particularmente susceptible al daño por EO puesto que tiene una gran demanda oxigénica y una baja cantidad de antioxidantes; por esto, este tejido pierde sus funciones durante el envejecimiento, generando condiciones propicias para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Se sabe que existen diversos inductores químicos de Nrf2 que promueven la translocación nuclear de este factor, entre los cuales se encuentra el tBHQ, que además de ser un electrófilo, es capaz de reaccionar con los grupos tioles nucleofílicos, incluyendo grupos sulfhídricos (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008). El uso de este tipo de inductores ha demostrado proteger a los animales y las células de agentes tóxicos. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados han usado modelos de animales jóvenes *in vitro* e *in vivo* o deletando a la proteína *in vivo*, por lo que la interrogante se basa en saber si los animales viejos serán capaces de inducir la respuesta antioxidante vía Nrf2 y obtener así protección contra diversos estímulos tóxicos.

Con estos antecedentes, surge el interés de esclarecer que sucede en un modelo *in vivo*, en ratas viejas, al administrar 3NP para generar EO, y al mismo tiempo reproducir algunas de las características de la EH, para después determinar si estos organismos responden al pre-tratamiento (PreT) con tBHQ y son capaces de activar a Nrf2 como mecanismo de protección contra el daño producido por el agente neurotóxico.

## **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Serán las células cerebrales provenientes de ratas viejas capaces de inducir una respuesta antioxidante y activar al factor de transcripción Nrf2 como mecanismo de defensa ante el daño producido por un agente oxidante cuando se pre-acondicionan con tBHQ?

## **5. HIPÓTESIS**

El envejecimiento está relacionado con la acumulación de daños generados por EO a lo largo de la vida de un organismo. Por lo tanto, si los animales viejos son capaces de activar una respuesta antioxidante mediante la inducción de la vía Nrf2 a través del PreT con tBHQ, entonces se logrará disminuir o contrarrestar el daño oxidante producido por la neurotoxina 3NP.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de protección del tBHQ sobre el DO producido por el tratamiento con 3NP, evaluando la respuesta antioxidante a través de la activación de Nrf2 en ratas viejas.

### 6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la dosis optima de tBHQ y 3NP en un modelo *in vivo* (ratas adultas). Obtener curva dosis-respuesta.
- Evaluar la conducta motora del grupo tratado con 3NP en comparación al grupo control, en ratas adultas y viejas.
- Cuantificar si el tratamiento con tBHQ y la activación de Nrf2 protegen las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por el tratamiento con 3NP en los grupos experimentales.
- Determinar si la protección de tBHQ induce un aumento en el contenido de Nrf2 en el núcleo en los grupos experimentales.
- Cuantificar los niveles de enzimas antioxidantes moduladas por Nrf2 (GST, HO-1, SOD-1).
- Evaluar el estado redox de cada grupo experimental mediante el cociente de GSH/GSSG y oxidación de proteínas.

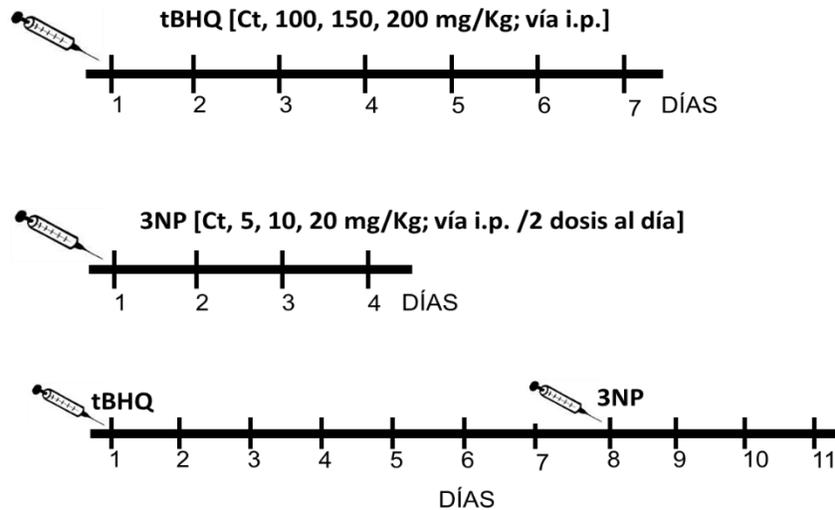
## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 ANIMALES

Para la realización de la presente tesis, se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 9 y de 24 meses de edad (adultas (350 gr) y viejas (550 gr) respectivamente). Las ratas fueron donadas por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), a cargo de la MVZ Rocío González Vieira. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura ambiente  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , con un ciclo de luz normal (12 horas) y obscuridad (12 horas) y con libre acceso a comida y agua. Se manejaron de acuerdo a los criterios establecidos por la “Guía para el cuidado de los Animales de Laboratorio” (Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina) y a la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

### 7.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizó un grupo control (Ct) al que solo se administró solución salina (vehículo). La administración de tBHQ y 3NP se realizó por separado, ambas a una concentración establecida por una curva dosis-respuesta (C DR). Por último, una vez establecidas las concentraciones del inductor y del agente neurotóxico, se administró tBHQ+3NP a un grupo experimental (*Figura 13*). Al término de los tratamientos, los animales fueron anestesiados y sacrificados para obtener el cerebro y llevar a cabo las determinaciones establecidas.



**Figura 13.** Esquema de administración para los grupos experimentales

### 7.3 AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS

Para el análisis por Western blot (WB) se realizó la técnica de fraccionamiento de tejido para obtener la fracción nuclear y citosólica. Brevemente, se tomaron aproximadamente 25 mg de tejido (cerebro) y se homogenizaron en buffer de extracción (Buffer A: 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, pH 7.9, y justo antes de usar se adicionó 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF). El homogenado se centrifugó a 3500 rpm por 10 min a 2°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 30 min a 4°C (**fracción citosólica, FC**). Al pellet se le agregó buffer A adicionando IGEPAL y se homogenizó y centrifugó a 3500 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperó el pellet y se adicionó el buffer C (20 mM HEPES, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.9, junto con 1 mM DTT y 1 mM PMSF) además de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se homogenizó y se centrifugó a 14000 rpm por 1 hora a 4°C, y el sobrenadante se tomó como **fracción nuclear (FN)**.

## 7.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Una vez obtenidas las fracciones nuclear y citosólica, la concentración de proteína fue determinada en el sobrenadante usando el agente comercial Bradford [*BioRad, Hercules CA, USA*] (Bradford, 1976).

## 7.5 WESTERN BLOT

Después de cada tratamiento descrito de acuerdo al protocolo experimental (*Figura 13*), se prepararon homogenados de cerebro para realizar el análisis de WB, y con ello determinar el contenido de Nrf2 a las diferentes concentraciones de la CDR para tBHQ y 3NP, así como para el grupo experimental de tBHQ+3NP en ambas fracciones celulares. Se cuantificó el contenido de enzimas antioxidantes de cada grupo experimental en la FC. Para ello, las proteínas se separaron por SDS-PAGE usando gel de resolución al 12%; después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno [PVDF, *Amersham Hybond™-P*]. Los sitios de unión no específicos se bloquearon por 1h a temperatura ambiente con 8% (w/v) de leche descremada. Se realizaron lavados a temperatura ambiente con TBS-T. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo primario; subsecuentemente se realizaron lavados con TBS-T. Las membranas se incubaron (90 min a temperatura ambiente) con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano [HRP, *Santa Cruz Biotechnology*] en buffer TBS-T, y después se realizaron lavados a temperatura ambiente con buffer TBS-T. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia [*Inmobilon™ Western*,

*Millipore, Bellerica, USA*] y se cuantificó la intensidad de pixeles mediante el programa de Kodak® [*LOGIC 1500*]. Los anticuerpos primarios utilizados: anti-Nrf2, anti-GST, anti-SOD, anti-NFκB p50, anti-NFκB p65, anti-Lamina [*Santa Cruz Biotechnology*], anti-HO-1 [*BioVision*], anti-PGC1α [*Abcam*] y anti-Actina.

## **7.6 DERIVATIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS OXIDADAS EN CEREBRO**

Una vez que se tuvieron los tejidos homogenizados, se tomaron 5 µg de proteína, a los cuales se les adicionó 5 µl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 12%. Después de 5 min se adicionaron 10 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1X) y la mezcla de reacción se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 min, seguido por la adición de 7.5 µl de solución neutralizadora a todas las muestras. Veinticinco microgramos de las proteínas derivatizadas con dinitrofenilhidrazona (DNP) fueron separadas por SDS-PAGE (gel de resolución al 12%), seguido por un WB usando membrana de PVDF de acuerdo al protocolo para la detección de proteínas oxidadas Oxiblot™ (No. catálogo S7150; *Millipore, Billerica, MA*). La membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para el motivo DNP. Este paso fue seguido por la incubacion con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (goat anti-rabbit IgG) dirigido contra el anticuerpo primario. Las bandas de la proteina fueron escaneadas y su intensidad fue cuantificada usando un densitómetro. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia [*Inmobilon™ Western, Millipore, Bellerica, USA*] y se cuantificó la intensidad de pixeles mediante el programa de Kodak® [*LOGIC 1500*] (Alarcón-Aguilar, 2014).

## 7.7 EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA

La prueba de conducta empleada para el modelo de 3NP fue la conducta locomotora [*Versamax Animal Activity Monitor*]. La prueba se realizó en la oscuridad, con un tiempo de 15 min por cada animal. Se empleó el equipo [*AccuScan Instruments, Inc. Columbus, Ohio USA*], que registra la medición de los movimientos horizontales (MH), movimientos verticales (MV) y la distancia total recorrida (DTR) (Pérez-De la Cruz, 2009).

## 7.8 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Una vez que se obtuvieron los grupos experimentales, todos los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (ip) con 500 µl de pentobarbital de sodio y se perfundieron vía transcardiaca con 0.9% de solución salina que contenía heparina (200/1 v/v), seguido de *p*-formaldehído al 4% a 4°C. Los cerebros fueron extraídos, posteriormente fijados en *p*-formaldehído al 4% por 2 días y embebidos en parafina. Los tejidos fijados se seccionaron en serie en un micrótopo 820 HistoSTAT [*American Instrument Exchange Inc., Haverhill, MA, USA*]. Se obtuvieron las secciones del cuerpo estriado (5 µm de espesor) cada 100 µm, cubriendo una distancia total de 300 µm (100 µm anterior y 100 µm posterior al trayecto de la navaja). Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para visualizar los cuerpos celulares, usando un analizador de imágenes IM100 [*Leica Cambridge, UK*] (Colín-González, 2011).

## 7.9 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUIMICA DE LA PROTEÍNA ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP)

La detección de GFAP fue empleada como un marcador morfológico de gliosis reactiva. Brevemente, los cerebros se fijaron en 4% de *p*-formaldehído por 2 días, embebidos en parafina y rebanados en secciones de 5  $\mu$ m de grosor. Todas las secciones fueron marcadas inmunohistoquímicamente y desparafinadas en una serie de xileno y alcohol, y lavadas 3 veces en PBS. Después de lavar, las secciones se incubaron en 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 min para apagar la actividad del peróxido endógeno. Una vez más, las secciones se lavaron en PBS (2 veces por 5 min), incubadas en 10 mM de citrato de sodio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) a pH 6.0 en baño de agua por 30 min, lavadas tres veces en buffer PBS, e incubadas en 1% de albúmina sérica bovina (BSA) para bloquear la inmunoreactividad no específica. Después de lavar 2 veces consecutivas con buffer Tris, las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C en buffer Tris que contenía el anticuerpo primario que reconoce a GFAP (dilución 1:100) [DAKO; *Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA*]. El anticuerpo secundario fue anti-rabbit conjugado con HRP [DAKO *Kit, Dakocytomation*], y las secciones fueron visualizadas con diaminobenzidina. Las secciones fueron co-teñidas con hematoxilina, y entonces se montaron y visualizaron. Las secciones marcadas fueron examinadas usando un analizador de imágenes IM100 [Leica *Cambridge, UK*] (Colín-González, 2011).

## **7.10 MEDICIÓN DE GLUTATIÓN (GSH) Y DISULFURO DE GLUTATIÓN (GSSG) EN CEREBROS**

El contenido de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) se determinó por HPLC siguiendo un protocolo descrito por (Farriss, 1987; Gómez-Quiroz, 2008), con algunas modificaciones. Brevemente, el cerebro fue colectado en 1 ml de ácido perclórico/BPDS (APC/BPDS 1mM) y sonificado sobre hielo por 30 s; la suspensión fue centrifugada a 10000 rpm por 5 min a 4°C. Enseguida se utilizó el extracto puro a una dilución 1:10 con PBS, sin derivatizar. Se tomaron 100 µl de cada muestra y fueron inyectadas al sistema de HPLC [*Waters*] y separados por una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y 5 µm de partícula, y se utilizó como fase móvil 1% de acetonitrilo y un buffer de fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 2.7 (20 mM). Los eluidos fueron medidos por detección ultravioleta a 265 nm. El área bajo la curva se determinó mediante el uso de estándares de GSH/GSSG, partiendo diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 200 y 400 µM).

## **7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

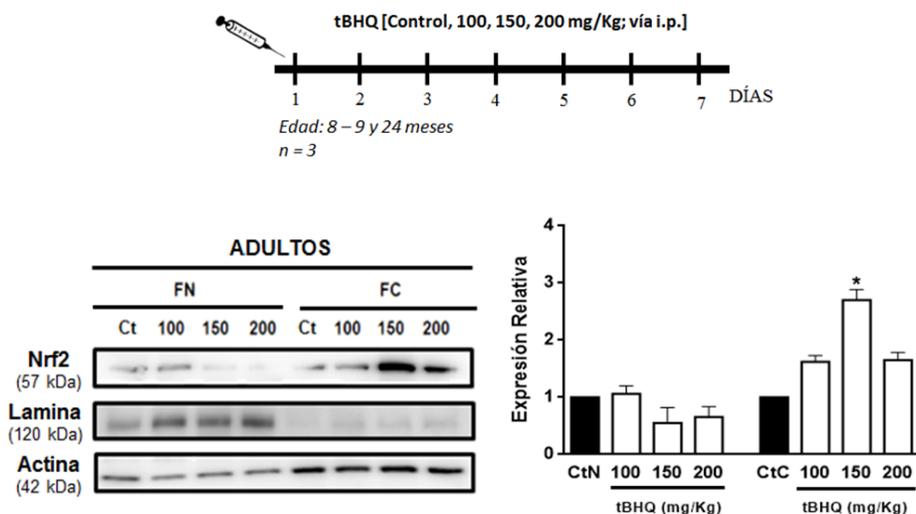
Los datos representan las medias ± desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes para cada experimento ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de un análisis post-test por comparaciones múltiples usando la prueba de Tukey [*GraphPad Prism versión 6.0*].

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CURVA DOSIS RESPUESTA DE tBHQ DURANTE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 EN CEREBRO DE RATAS ADULTAS

Se ha establecido que tBHQ puede usarse como inductor del factor de transcripción Nrf2 (Tasset, 2010), ya que tiene la capacidad de modificar el estado redox celular, actuando como una molécula pro-oxidante e induciendo la oxidación de Keap1, lo que libera a Nrf2. Pero al mismo tiempo, tBHQ puede provocar EO y daño celular. Por lo tanto, para determinar si las dosis empleadas tenían algún efecto sobre la translocación de Nrf2 en respuesta a la exposición de tBHQ, se realizó una CDR, para así poder establecer la concentración experimental a la cual se lleva a cabo la activación de Nrf2 en el modelo *in vivo*. Para esta curva se emplearon ratas adultas de 9 meses, y posteriormente los tiempos y dosis elegidas se usaron para tratar a las ratas viejas de 24 meses.

La *Figura 14* muestra los resultados obtenidos después de tratar a las ratas con diferentes dosis de tBHQ: 0, 100, 150 y 200 mg/Kg, durante 7 días. Nuestros resultados sugieren que Nrf2 responde al tratamiento con tBHQ en la fracción nuclear (FN) a la concentración de 100 mg/Kg, aunque no se encontraron diferencias significativas con respecto al Ct y al resto de las dosis (*Figura 14*). En cuanto a la fracción citosólica (FC), se aprecia que el mayor contenido de Nrf2 fue a 150 mg/Kg (150% más con respecto al control,  $p < 0.05$ ) (*Figura 14*), lo que sugiere un incremento en su expresión.



**Figura 14. Curva dosis respuesta de tBHQ durante la activación de Nrf2, en ratas adultas (9m).**

*Inmunoblot de la Curva Dosis-Respuesta de tBHQ durante la activación de Nrf2. El contenido de Nrf2 fue determinado por Western blot a las distintas concentraciones de tBHQ (100, 150 y 200 mg/kg) en ratas adultas durante 7 días. El análisis densitométrico fue normalizado con lámina para la fracción nuclear y actina para la fracción citosólica (como controles de carga) seguido de una segunda normalización considerando al grupo control como 1. Abreviaturas: Fracción nuclear (FN), fracción citosólica (FC), Control núcleo (CtN), control citosol (CtC). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Para estos resultados \*  $p < 0.05$  150 mg/Kg vs CtC.*

## 8.2 CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO DE 3NP SOBRE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 EN CEREBRO DE RATAS ADULTAS

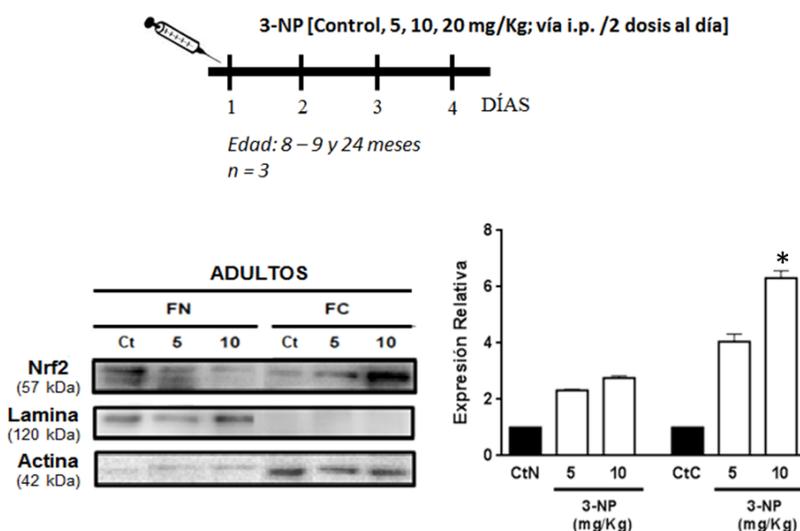
La vulnerabilidad de las células neuronales a las acciones nocivas de las ERO/ERN resulta en el EO y EN; estos tipos de estrés juegan un papel determinante como factores causales primarios en diversas neuropatías (Luna-López, 2010).

El tratamiento con 3NP usado en nuestro modelo experimental tiene como intención desarrollar un estado de EO (daño agudo), así como modelar *in vivo* algunas de las características fisiológicas de la patogénesis de la EH. Por lo que a través de una CDR se estableció la dosis a utilizar para generar ambas condiciones; cabe

mencionar que las dosis de la curva se establecieron con respecto a las reportadas en la literatura (Borlongan, 1997a; Abdel-Wahab, 2005).

En la *Figura 15* se presentan los resultados obtenidos en la activación de Nrf2 después de que se realizó la administración de 3NP a distintas concentraciones 0, 5, 10 y 20 mg/Kg de peso. Es importante mencionar que a la concentración de 20 mg/Kg (en nuestras condiciones experimentales) generó más del 70% de muerte en nuestros animales experimentales después de dos días de la primera administración, por lo que se eliminó de la CDR y de la figura. En general, en todos los tratamientos se observaron cambios como inmovilidad en las patas traseras de los animales, así como disminución en el peso corporal, lo cual concuerda con los datos reportados por diversos grupos de trabajo (Borlongan, 1997a; Montes de Oca, 2013).

El análisis de Western blot mostró que no se encontraron cambios significativos en el contenido de Nrf2 (*Figura 15*) en la FN, lo que sugiere que 3NP no está activando directamente a Nrf2. Con respecto a la FC, se presentó una diferencia estadísticamente significativa a la concentración de 10 mg/Kg con respecto al Ct (*Figura 15*).



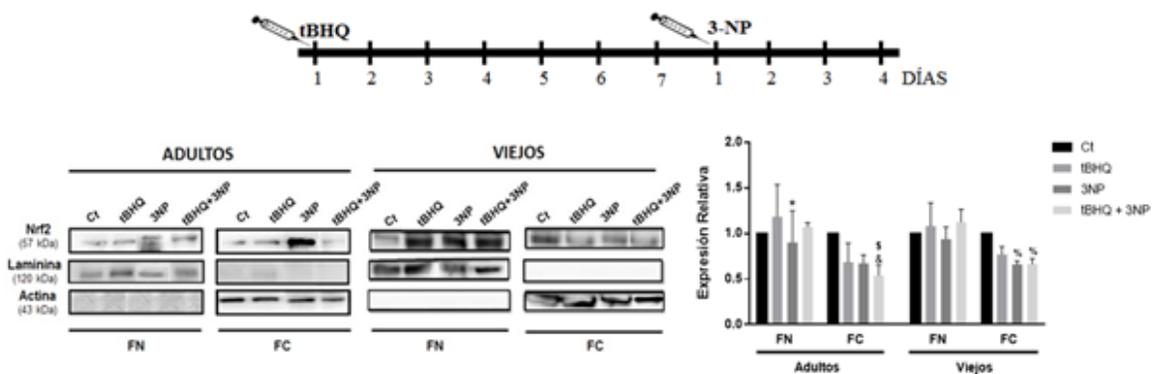
**Figura 15. Curva dosis respuesta de 3NP durante la activación de Nrf2, en ratas adultas (9 m).** Western blot de la CDR de 3NP durante la activación de Nrf2. El contenido de Nrf2 fue determinado por Western blot a las distintas concentraciones de 3NP (5 y 10 mg/kg) en ratas adultas durante 4 días, dos dosis al día. Abreviaturas: Fracción nuclear (FN), fracción citosólica (FC), Control núcleo (CtN), control citosol (CtC). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes; \*  $p < 0.05$  vs CtC

### 8.3 COMPARACION DE LOS EFECTOS DEL PreAc CON tBHQ SOBRE Nrf2 EN ANIMALES ADULTOS Y VIEJOS EXPUESTOS A TODOS LOS TRATAMIENTOS.

Se decidió emplear las concentraciones establecidas en las CDR de tBHQ y 3NP (100 mg/Kg y 10 mg/Kg, respectivamente) realizadas en ratas adultas, para evaluar su efecto en ratas viejas, y se determinó el contenido de Nrf2 bajo el mismo esquema de tratamientos. En dichas condiciones experimentales se observó un aumento importante en el contenido de Nrf2 en la FN del cerebro de ratas viejas tratadas con tBHQ (100%). En cuanto a la neurotoxina, se aprecia que no hay un aumento en los niveles de Nrf2 en la FN aunque no es estadísticamente significativo (Figura 16), por lo que nuestros datos sugieren que hay cambios importantes en el

contenido de Nrf2 bajo el tratamiento con tBHQ en ratas viejas. Una vez que se observó el contenido de Nrf2 después del tratamiento de tBHQ y 3NP en ratas adultas y viejas, se realizó la comparación de los efectos en el contenido de Nrf2 en animales adultos y seniles, pero esta vez PreT con tBHQ.

Nuestros datos arrojados del análisis de Western blot sugieren que los animales viejos si llevan a cabo la translocación de Nrf2 en comparación a las ratas adultas en donde se logra observar una translocación de Nrf2 como respuesta de protección luego de ser pre-acondicionadas con tBHQ, aunque no se encontraron diferencias significativas; además se aprecia una disminución en el contenido de Nrf2 en la FC comparados con el Ct en ratas adultas, observándose un efecto similar en los animales viejos (Figura 16), aunque nuestros resultados no son estadísticamente significativos nos permiten determinar que los animales viejos podrían encender la vía de Nrf2 como mecanismo de protección.



**Figura 16. Translocación nuclear de Nrf2 en ratas adultas (9m) y viejas (24 m) después de los tratamientos con tBHQ, 3NP y PreAc.**

Imágenes representativas de los Western blots de la FN y FC durante la activación de Nrf2 tras el tratamiento con tBHQ y 3NP en ratas viejas, así como PreAc. Abreviaturas: Fracción nuclear (FN), fracción citosólica (FC). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs tBHQ;  $\& p < 0.05$  vs Ct;  $\$ p < 0.05$  vs 3NP; %  $p < 0.05$  vs Ct.

## **8.5 ENZIMAS ANTIOXIDANTES MODULADAS POR Nrf2 EN CEREBROS DE RATAS ADULTAS Y SENILES TRATADOS CON tBHQ, 3NP Y PreAc.**

La activación de Nrf2 permite llevar a cabo la transcripción de genes de enzimas antioxidantes para contender contra el daño producido en la célula o como parte de la activación de la vía canónica de Nrf2 para mantener el balance redox en la célula (balance pro-oxidante/antioxidante). Ejemplo, de las enzimas moduladas por Nrf2 se encuentran GST,  $\gamma$ -GCS, SOD, HO-1 (Lee, 2003; Forman, 2004; Colín-González, 2013). En la *Figura 16* se observa que hay un incremento de Nrf2 en la FN lo cual verifica que Nrf2 está respondiendo al estímulo de tBHQ induciendo la respuesta antioxidante en los animales viejos. En relación a ello, el hecho de no encontrar un aumento estadísticamente significativo de Nrf2 en animales adultos y viejos puede ser importante, ya que como la translocación de Nrf2 al núcleo es un evento transitorio, y estas determinaciones se realizaron solo en un momento determinado, pudiera ser que el tiempo de mayor inmunolocalización nuclear de Nrf2 no coincidiera con el tiempo en el cual se están llevando a cabo las determinaciones experimentales. Por ello se decidió evaluar el contenido de algunas enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2, ya el incremento de las enzimas es un evento más duradero que podría indicar la activación previa de Nrf2.

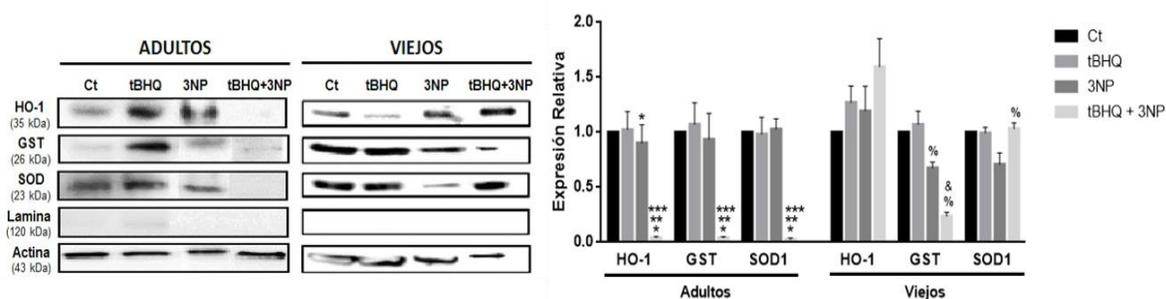
En este caso se determinó el contenido de algunas enzimas de fase II, después de ser tratadas únicamente con tBHQ. Como se observa en la *Figura 17*, en los animales adultos no hay cambios significativos en las enzimas antioxidantes

medidas; no así en los animales seniles en donde la HO-1 presenta un aumento en su contenido aunque no es estadísticamente significativo con respecto al Ct, en lo que respecta a GST y SOD no se observan cambios significativos con respecto al Ct en animales viejos.

Posteriormente investigamos si la toxina *per se* sería capaz de inducir alteraciones redox caracterizadas por el incremento en la cantidad de las enzimas antioxidantes (HO-1, GST, SOD (Cu/Zn)) en correlación directa a su papel estimulador en la regulación de Nrf2. Se observa en la *Figura 17* que las enzimas evaluadas no aumentan su contenido después del tratamiento con 3NP en el caso de las ratas adultas, a excepción de HO-1 que presenta una disminución significativa con respecto a tBHQ (10%,  $p < 0.05$ ). Mientras que en los animales viejos se observa un aumento en HO-1 que no es estadísticamente significativo, en comparación a GST que presenta una disminución estadísticamente significativa con respecto al Ct (30%,  $p < 0.05$ ). Para el caso de la SOD, se observa una disminución en su contenido aunque no es significativo. Como era de esperar, lo anterior indica que el 3NP por sí mismo no logra incrementar las enzimas antioxidantes, a excepción de HO-1 aunque esta no presenta diferencias con respecto al Ct.

Una vez comprobado que la toxina 3NP no activa la respuesta antioxidante y que el tBHQ lo hace de manera significativa importante, se procedió a evaluar si el pre-acondicionamiento con tBHQ confería protección evaluando el aumento de dichas enzimas antioxidantes. Como se puede observar en la *Figura 16*, las enzimas antioxidantes determinadas en los cerebros de los animales adultos se encuentran por debajo del Ct (90%,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ) siendo estadísticamente

significativos con respecto al grupo Ct. En lo que respecta a los animales seniles se aprecia que estas enzimas se encuentran en niveles superiores en comparación a las ratas adultas, independientemente de las condiciones experimentales. Siendo la GST quien se encuentra disminuida significativamente (70%,  $p < 0.001$ ) con respecto al Ct en comparación al resto de los tratamientos



**Figura 17. Comparación de las enzimas antioxidantes moduladas por Nrf2 en todos los tratamientos en animales adultos y viejos.**

Imágenes representativas de los Western blots de la FC durante la activación de Nrf2 tras el tratamiento con tBHQ y 3NP en ratas viejas, así como PreAc. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs tBHQ y Ct; \*\* $p < 0.01$  vs Ct y 3NP; \*\*\* $p < 0.001$  vs Ct; % $p < 0.05$  vs Ct, tBHQ y 3NP; & $p < 0.001$  vs Ct.

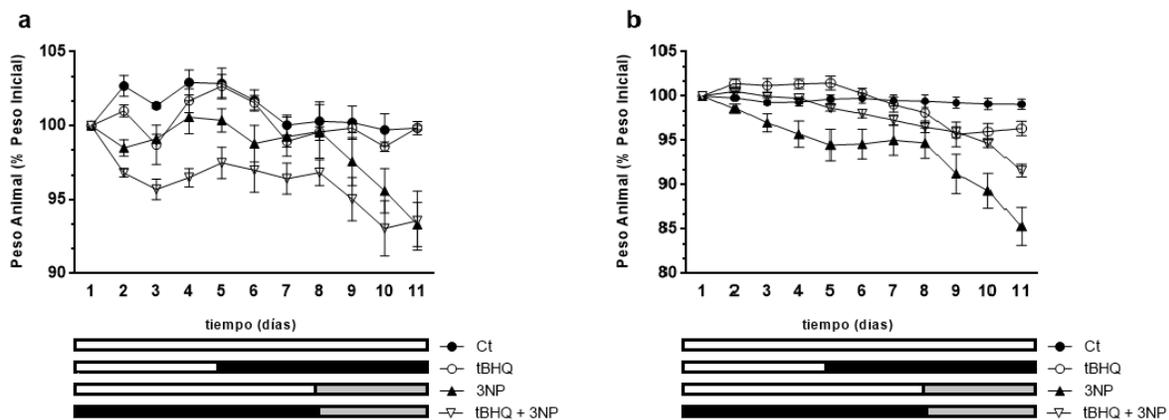
## **8.8 PESO CORPORAL DE LAS RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON TBHQ**

A continuación se evaluó si el pre-acondicionar a los animales con tBHQ podría reflejarse en la recuperación de la masa muscular (MM) y la conducta motora, en comparación al grupo tratado con 3NP.

La toxicidad por 3NP fue monitoreada a través del registro del PC (*Figura 18*) y los síntomas motores (*Figura 19*). Una ventaja de utilizarla evaluación conductual como un complemento a la histología es que puede realizarse repetidamente en los mismos animales, proporcionando una medida de la progresión de la toxicidad 3NP (Shih, 2005).

La pérdida de MM (*Figura 18*) debido a la exposición al 3NP no solo se debe a su posible acción sobre otras regiones cerebrales (como los centros del apetito (hipotálamo)), ya que el 3NP actúa en toda célula que tenga mitocondrias (aunque preferentemente se dirige a las del estriado) (Pérez-De la Cruz y Santamaría, 2007), pero también a otros tejidos y grupos celulares de órganos periféricos. El origen, entonces de la pérdida de peso, involucra diversos sistemas además que podría deberse a pérdida de MM por déficit energético en células musculares, entre otras.

Similar a otras toxinas mitocondriales, la neurotoxicidad de 3NP ha sido atribuida a la producción de ERO durante el daño energético. De acuerdo con ello, estrategias específicas para reducir el EO han mostrado atenuar el daño neuronal relacionado al 3NP y disfunción neurológica; la propuesta en la presente investigación es el PreT con tBHQ.



**Figura 18. Registro del peso corporal de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.**

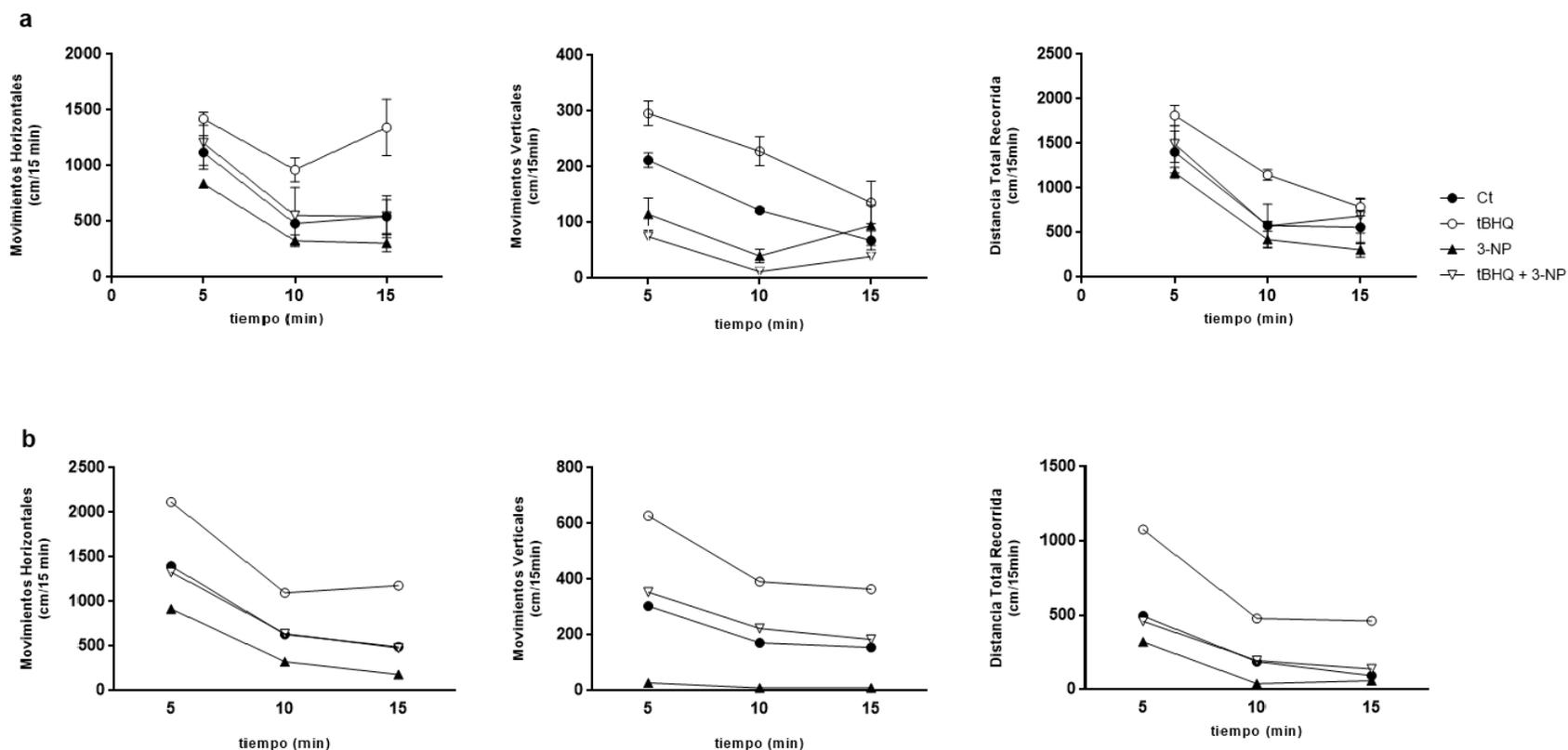
Registro de la pérdida de masa muscular en ratas adultas (a) y viejas (b) durante los diversos tratamientos. El peso corporal fue evaluado antes de comenzar el esquema de administración de 3NP (así como de tBHQ y tBHQ+3NP). El régimen del tratamiento con 3NP consistió de 16 inyecciones vía intraperitoneal en total, con una inyección cada 8 horas entre cada inyección (dos dosis al día). Todos los animales fueron anestesiados y sacrificados luego de cada tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de tres y cinco experimentos independientes para animales adultos y viejos, respectivamente. Los rectángulos blancos representan los días del grupo control, los rectángulos negros el tratamiento con tBHQ y el rectángulo gris el esquema con 3NP.

Conforme a los resultados graficados en la *Figura 18*, se observa que el solo tratamiento de tBHQ genera una disminución del PC en ambos grupos de animales, con mayor énfasis en las ratas adultas, aunque sin diferencias estadísticas. En lo que respecta al PreT, se aprecia que tanto las ratas adultas como viejas logran recuperar su masa corporal casi a niveles del Ct al término del tratamiento, aunque este efecto no es estadísticamente significativo.

## **8.9 CONDUCTA DE LAS RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON tBHQ**

Los resultados de comportamiento bajo las condiciones experimentales antes mencionadas muestran una disminución en la movilidad de los animales en el tiempo y en el dispositivo en todos los grupos (incluidos controles, *Figura 19*), lo cual es de esperarse pues llevan a cabo un proceso llamado habituación. Es decir, los animales llegan a reconocer el dispositivo y se mueven menos porque uno de los instintos básicos de los roedores es la búsqueda, pero al conocer bien su medio “apagan” ese instinto. En relación a la hipoactividad inducida por el 3NP, hay reportes que la avalan (Pérez-De la Cruz, 2007) y se homologa a la etapa hipocinética de los pacientes con Huntington, tanto en las ratas adultas como viejas (*Figura 19*). Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Borlongan, quien reporta un patrón hipercinético durante las primeras dos semanas después de la exposición a 3NP, seguido por un patrón hipocinético pronunciado durante las últimas dos semanas, con alteraciones que son dependientes de la edad (Borlongan, 1995a, 1997b; Koutouzis, 1994b). Cuando se toman en cuenta todos estos resultados, se sugiere que 3NP mimetiza tanto las etapas tempranas como tardías de la EH (Borlongan 1995b, Shear 1998). Varios estudios han definido tres etapas producida por 3NP cuando es administrado a animales: 1) Somnolencia, 2) Marcha descoordinada con movimientos estereotipados y de balanceo, y 3) decúbito ventral y lateral (Borlongan 1995a). Aunado a ello, la administración sistémica de 3NP resulta en lesiones en ganglios basales con una disminución inicial en la actividad motora, seguido por episodios ocasionales de hiperactividad y movimientos anormales (por ejemplo, temblor, rigidez, movimiento de cabeza) (Ludolph, 1991).

En lo que respecta al antioxidante tBHQ, se observa un patrón de hiperactividad en ambos grupos de animales (adultos y viejos, *Figura 19*). Este patrón no debe ser interpretado como toxicidad, ya que el tBHQ podría estar estimulando la motricidad pues puede favorecer procesos pro-energéticos *per se*. Aun cuando nuestros resultados para las ratas viejas (n=2) y adultas no son estadísticamente significativos por ser un número pequeño de muestra, sugieren que el PreT con el inductor de Nrf2 está ejerciendo un papel de protección luego del daño producido por el agente neurotóxico.



**Figura 19. Registro de la conducta de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.**

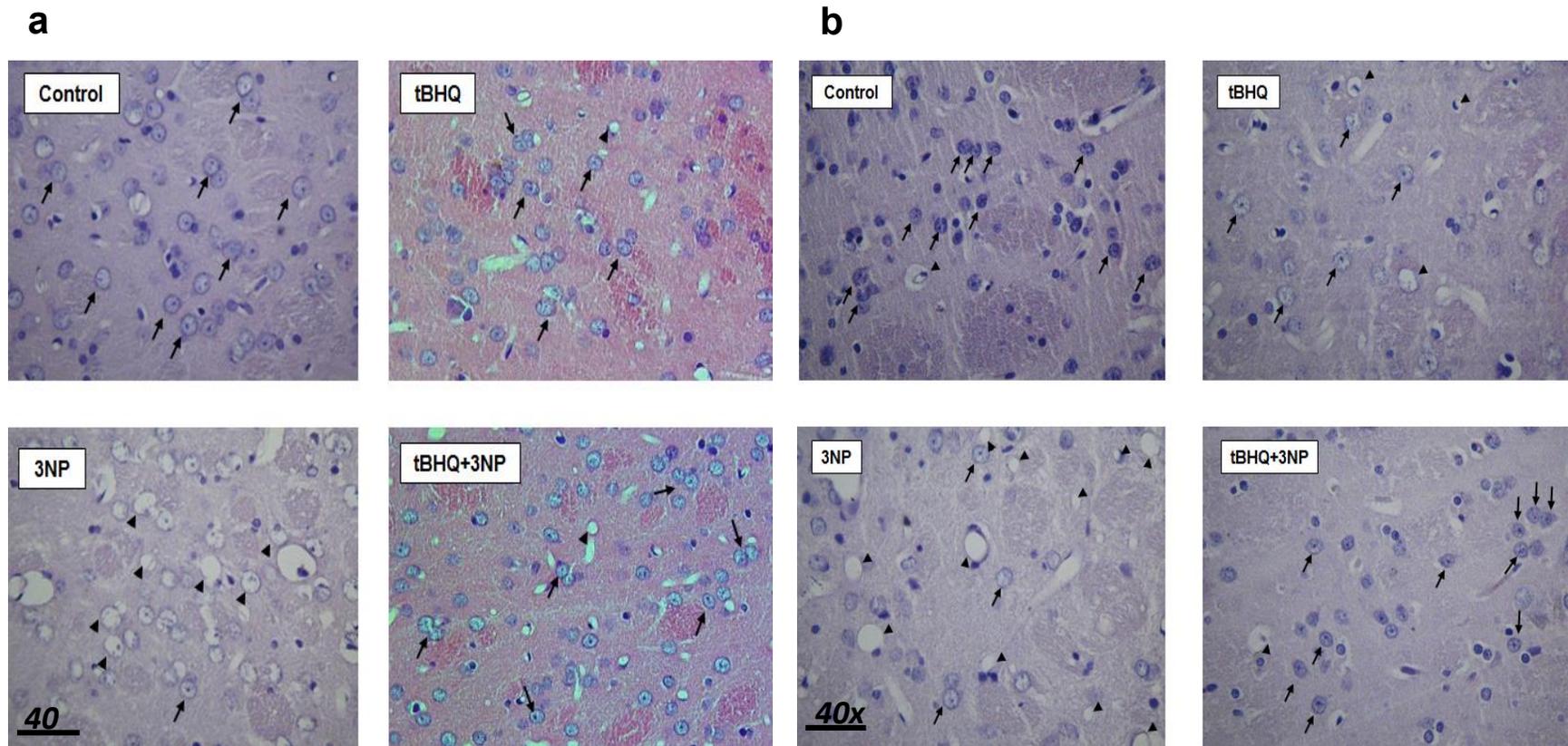
La prueba de comportamiento evaluada para el modelo de 3NP fue la prueba de conducta motora. Los animales adultos (a) y viejos (b) con los diferentes tratamientos fueron sometidos a dicha prueba por un tiempo de 15 min, después de lo cual fueron anestesiados y sacrificados para las diferentes determinaciones experimentales. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres y dos experimentos independientes para animales adultos y viejos, respectivamente

## **8.10 MORFOLOGÍA DEL NÚCLEO ESTRIADO Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL DAÑO CELULAR ESTRIATAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS DESPUES DE LOS TRATAMIENTOS**

Las secciones del tejido estriatal fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), y los criterios generales considerados para evaluar a las neuronas dañadas incluyen núcleos picnóticos y vacuolaciones citoplasmáticas. El número de células neuronales preservadas, dañadas y totales fueron obtenidos como un promedio de cinco campos seleccionados al azar de tres secciones de cuerpo estriado por rata. Los datos se expresaron como daño neuronal por campo. En contraste con un aspecto bien conservado del tejido estriatal del grupo Ct, los animales tratados con 3NP (adultos y viejos, *Figura 20*) muestran un daño celular considerable, revelando una extensa pérdida de células neuronales a lo largo del cuerpo estriado, abundantes núcleos picnóticos, células reducidas en tamaño y un aumento en el volumen de los estriosomas. Sin embargo, no se observó destrucción del neuropilo. Las muestras de animales a los cuales se les administró únicamente tBHQ y los que se pre-acondicionaron con tBHQ antes del tratamiento con 3NP, mostraron diferencias con respecto al grupo tratado con 3NP, ya que se distingue una apariencia normal del tejido estriatal similar al grupo Ct (*Figura 20*), lo cual se puede reflejar en la evaluación cuantitativa de los daños en el núcleo estriado (*Figura 21*). Los animales del grupo tratado con 3NP mostraron aproximadamente el 70% de neuronas dañadas (tanto para las adultas como seniles), con lesiones producidas por el agente neurotóxico en caudado-putamen en comparación al grupo Ct. Con respecto al grupo tBHQ+3NP se observa una disminución importante en las

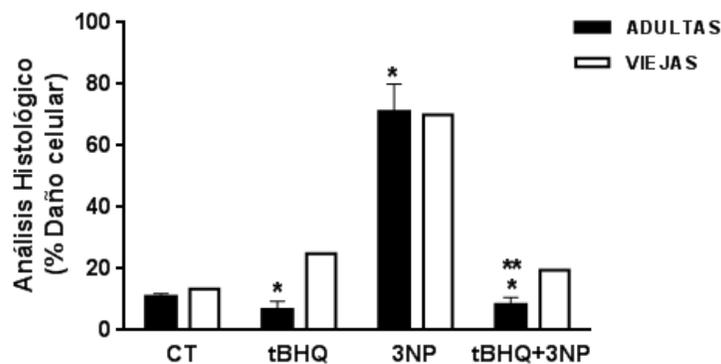
neuronas dañadas (cerca del 10 y 20% para adultas y viejas, respectivamente) al igual que en el grupo con tBHQ (aproximadamente 5 y 20% para adultas y viejas, respectivamente) (*Figura 20 y 21*).

Con todo lo anterior podemos afirmar que hay una pérdida importante de las neuronas GABAérgicas al administrar 3NP, pero al ser pre-tratadas con el inductor de Nrf2, el tejido estriatal se protege a niveles del Ct, tanto para los animales adultos como seniles.



**Figura 20. Citoarquitectura del núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.**

*Detalles morfológicos de tejidos estriatales de ratas adultas (a) y viejas (b). Los animales fueron inyectados con 3NP (10 mg/Kg, vía ip), tBHQ (100 mg/Kg) y tBHQ+3NP (100+10 mg/Kg), anestesiados y sacrificados luego de cada tratamiento. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a la sección de materiales y métodos. Los cambios morfológicos fueron analizados por microscopia (40x), se muestran las células normales (flechas) y las células picnóticas (punta de flecha).*



**Figura 21. Análisis cuantitativo del daño observado en el núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.**

*El análisis cuantitativo se realizó contando el número de células muertas en el análisis histológico del núcleo estriado en ratas adultas y viejas con cada tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes (ratas adultas), y de 2 experimentos independientes para las ratas viejas. \*  $p < 0.05$  vs Ct, tBHQ vs 3NP, \*\*  $p < 0.01$  3NP vs tBHQ+3NP*

### **8.11 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ACÍDICA (GFAP) EN TEJIDO ESTRIATAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON tBHQ**

Se sabe que los astrocitos tienen una gran variedad de funciones en el cerebro, (Kettenman, 1995; Magistretti, 1999; Bezzi, 2001), en especial las que tienen que ver con protección y reparación, por lo que cualquier tipo de lesión del SNC puede estimular su proliferación en una respuesta que se conoce como gliosis reactiva. Es por ello que se realizó un análisis inmunohistoquímico para identificar la presencia de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), una de las principales proteínas de filamentos intermedios de las células gliales la mayor estructura del citoesqueleto

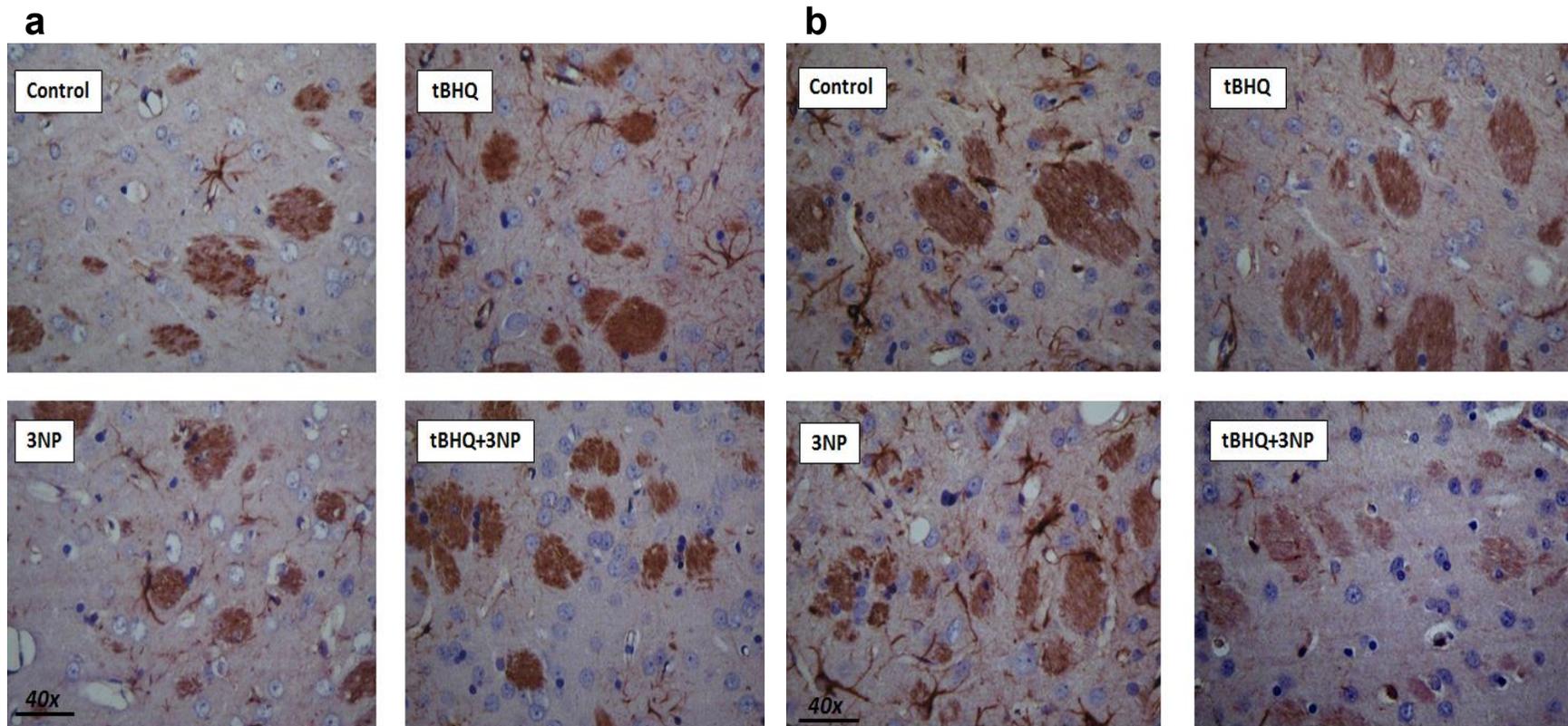
en los astrocitos (Porchet, 2003), además de no encontrarse en otros tipos celulares que componen el tejido nervioso.

Las reacciones astrocíticas podrían ocurrir durante el proceso normal de envejecimiento. Como se observa en el detalle morfológico del tejido estriatal (*Figura 22*), los niveles de GFAP incrementan con la edad (aproximadamente 4 veces más) en comparación a los adultos, esto debido a que GFAP se encuentra más en astrocitos maduros durante el envejecimiento y en astrocitos reactivos (Porchet, 2003).

En la *Figura 23* puede apreciarse que el tratamiento con 3NP induce un aumento considerable de astrogliosis en ambos grupos experimentales (25 y 30% en adultos y viejos, respectivamente). El proceso de astrogliosis es definido como el aumento en el número de astrocitos e hipertrofia de estas células y pueden también observarse en muchos otros procesos como inflamación del SNC y daño vascular (Porchet, 2003).

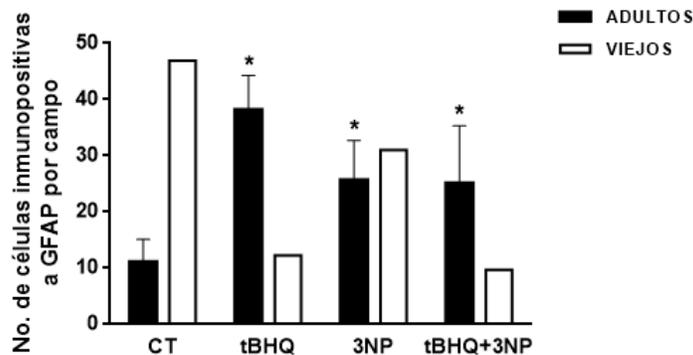
Es importante apreciar que tan solo con el tratamiento con tBHQ las ratas adultas sufren un mayor daño (cerca del 40%) en comparación a las ratas viejas. La lesión cerebral lleva a cabo la activación de astrocitos, esto debido a que tBHQ no solo posee propiedades antioxidantes, sino que puede actuar como agente pro-oxidante pues en su ciclo de oxidación-reducción, puede llevar a cabo la producción de ERO. Estos eventos podrían no solo activar astrocitos, sino también activar a la microglia, evento mediado por citocinas y factores de crecimiento como IL-1, IL-6, TGF- $\alpha$  (Lenz, 1997). Con respecto al PreAc con tBHQ, hay una disminución considerable

de la astrogliosis en animales seniles, en comparación a los adultos (*Figura 23*). Nuestros datos sugieren que los animales viejos tienen capacidad de encender la vía Nrf2 como mecanismo de protección.



**Figura 22. Inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.**

*La detección de GFAP fue empleada como marcador morfológico de gliosis reactiva. Los detalles morfológicos estriatales de ratas adultas (a) y viejas (b) con los diversos tratamientos. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a la sección de materiales y métodos. Los cambios morfológicos fueron analizados por microscopia (40x).*



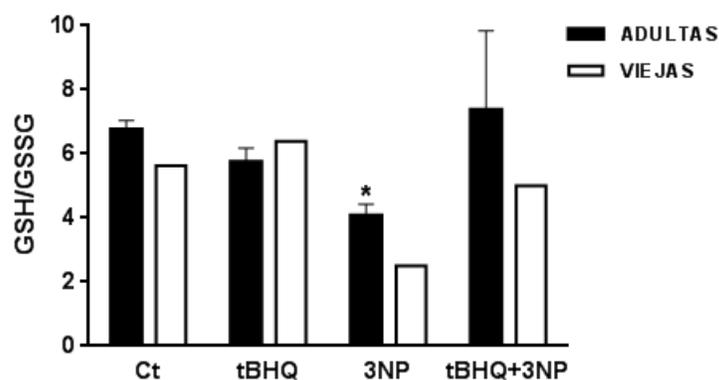
**Figura 23. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el núcleo estriado de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.**

*Comparación del análisis morfológico de la proteína GFAP del núcleo estriado en ratas adultas y viejas con cada tratamiento. Los resultados representan la media ± DE de 3 experimentos independientes (ratas adultas), y de 2 experimentos independientes para las ratas viejas. \*  $p < 0.05$  vs Ct*

## 8.12 CAMBIOS EN EL ESTADO REDOX EN EL CEREBRO DE LAS RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON tBHQ

Una de las características del envejecimiento es su capacidad reducida de generar mecanismos homeostáticos celulares que protegen al cuerpo contra una variedad de insultos oxidativos, toxicológicos y patológicos (Harman, 1992; Shigenaga, 1994; Beckman, 1998). En el cerebro, durante el envejecimiento las concentraciones de glutatión plasmático disminuyen, lo cual podría indicar que la disminución de éste podría predisponer para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Bains, 1997; Martínez-Sámano, 2011). Por esa razón se determinó el estado redox en nuestro modelo a través del cociente GSH/GSSG en los diferentes grupos experimentales. De manera interesante, al ser tratados con el

3NP se observó una disminución del cociente en ratas viejas y adultas (de casi 2 veces) con respecto al PreAc y Ct; estos datos resultan interesantes ya que el 3NP genera un estado de estrés oxidante, como se ha reportado usando otros tóxicos como MPP+, LPS, entre otros (García-Nogales, 1999; Fan, 2008; Alarcón-Aguilar, 2014). Por lo tanto, el cociente GSH/GSSG en este modelo es un indicador sensible de estrés oxidante en cerebro. Cuando los animales fueron pre-acondicionados con tBHQ se observó un aumento del cociente GSH/GSSG que en el caso de los adultos llega hasta los niveles del control, y en el caso de los animales viejos se observa una disminución con respecto al Ct (*Figura 24*).

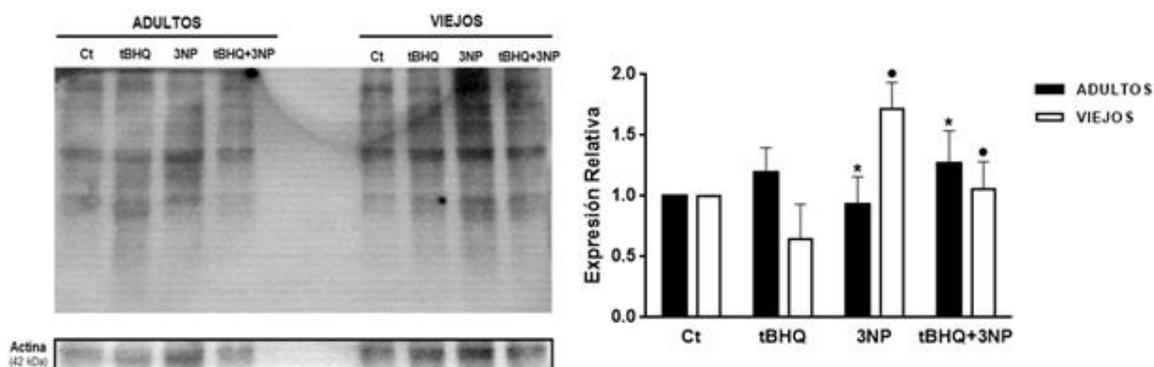


**Figura 24. Cambios en el estado redox en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ**

*Comparación del estado redox en ratas adultas y viejas con cada tratamiento. El cociente GSH/GSSG fue determinado mediante HPLC. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes (ratas adultas), y de 2 experimentos independientes para las ratas viejas. \* $p < 0.05$  vs Ct*

### 8.13 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS OXIDADAS EN EL CEREBRO DE LAS RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON tBHQ

Otro de los marcadores usados para la medición de EO es mediante la oxidación de proteínas. Para ello se realizó la comparación de las proteínas oxidadas en los grupos de estudio, observando que los animales viejos fueron los más afectados (*Figura 25*). En el grupo tratado con 3NP se observó un aumento considerable de proteínas oxidadas en los cerebros de las ratas viejas (70%), el cual es contrarrestado al pre-acondicionarse con tBHQ. En cuanto a las ratas adultas, se aprecia que las tratadas con 3NP presentan valores de oxidación semejantes al grupo Ct y que de manera importante al PreAc con tBHQ este daño pareciera que aumenta. Además, de manera interesante, los animales adultos tratados con tBHQ aumentan sus niveles de oxidación (50% más) con respecto a las ratas seniles tratadas solo con el inductor de Nrf2.

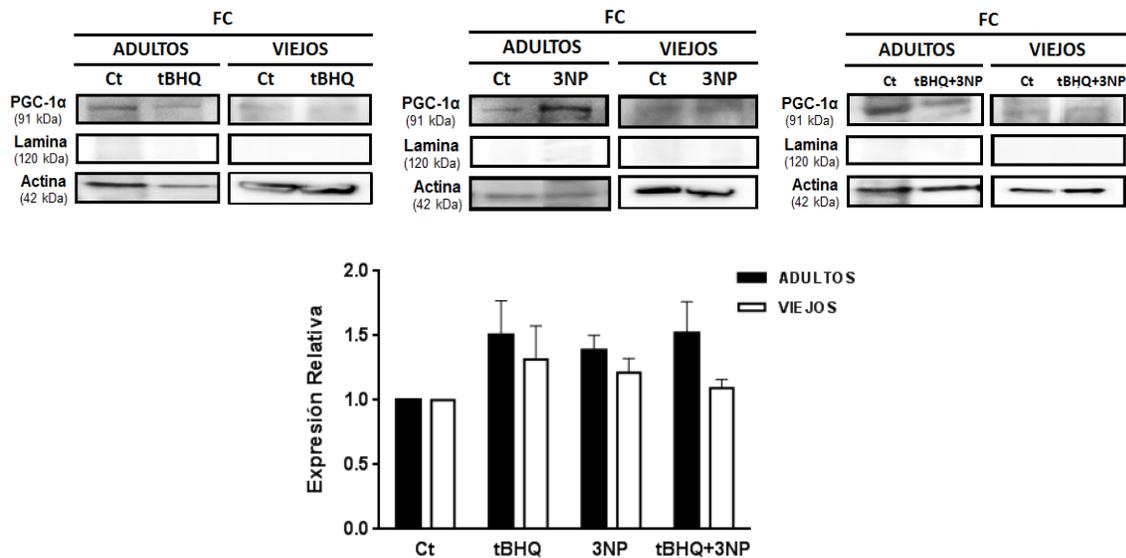


**Figura 25. Determinación de proteínas oxidadas en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.**

La oxidación de proteínas fue utilizada como marcador de estrés oxidante en animales adultos y viejos. Se muestra la comparación proteínas oxidadas usando como control de carga a actina, así como una segunda normalización tomando al control como 1. Los carriles vacíos corresponden a controles negativos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos. \* $p < 0.05$  vs tBHQ, Ct y tBHQ+3NP vs 3NP Adultos, \* $p < 0.05$  vs Ct Viejo

#### **8.14 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA PGC1- $\alpha$ EN EL CEREBRO DE LAS RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON TBHQ**

El receptor activado por el proliferador de peroxisomas y coactivadoras  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), además de ser un potente supresor de las ERO (Cui, 2006; St-Pierre, 2006), es un coactivador transcripcional que interactúa con varios factores de transcripción, incluyendo Nrf2 (Fujita, 2012) involucrados en una gran variedad de respuestas biológicas como la termogénesis adaptativa (Weydt, 2006), la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de glucosa (Puigserver y Spiegelman, 2003) y la biogénesis mitocondrial de varios tejidos (Liang y Ward, 2006; Reddy, 2009). Además, su activación puede tener efectos benéficos en el envejecimiento bajo condiciones patológicas, afectando a tejidos como el corazón, cerebro y músculo esquelético (Anderson y Prolla, 2009; Wenz, 2011). En relación a esto, se determinó el contenido de PGC1 $\alpha$  en los modelos de estudio como un mecanismo de sobrevivencia o protección adicional al efecto del PreAc con tBHQ. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los grupos tratados con respecto al control (*Figura 26*), por lo que posiblemente el mecanismo no esté vinculado con la biogénesis mitocondrial.



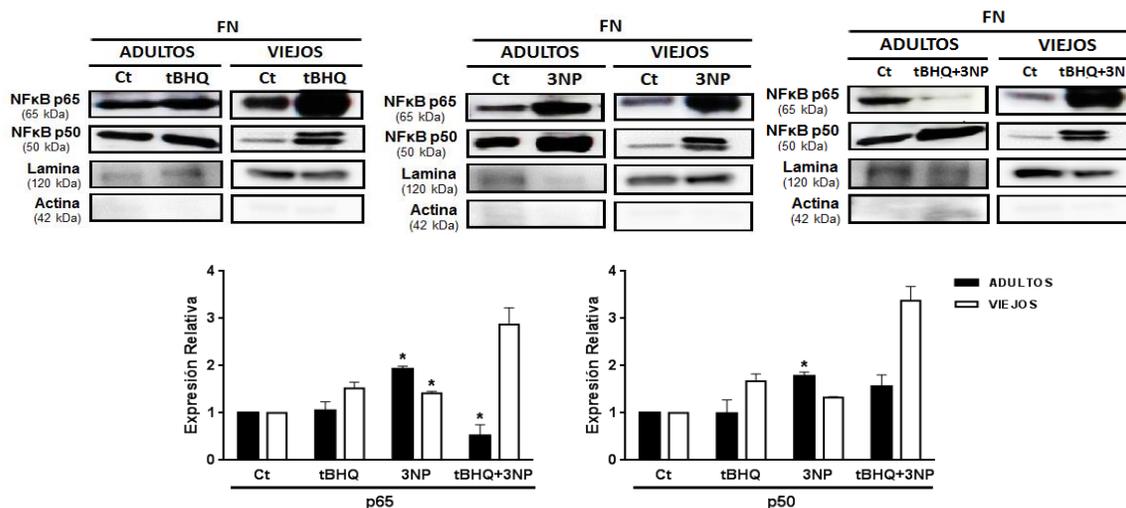
**Figura 26. Determinación de la proteína PGC1- $\alpha$  en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreT con tBHQ.**

*Immunoblots representativos del contenido de la proteína de biogénesis mitocondrial (PGC1 $\alpha$ ). El análisis densitométrico fue normalizado con lámina para la fracción nuclear y actina para la fracción citosólica (como controles de carga) seguido de una segunda normalización considerando al grupo control como 1. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.*

## 8.15 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF $\kappa$ B EN EL CEREBRO DE LAS RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRATADAS CON 3NP DESPUÉS DEL PreAc CON tBHQ

Como es bien conocido, el factor NF $\kappa$ B es responsable de regular la transcripción de varios genes cuyos productos son críticos para generar una respuesta de supervivencia apropiada para contrarrestar insultos como infección y daño (Spencer, 1997). La elevación del EO y exceso en ERO ha sido vinculada al proceso de envejecimiento; en relación a esto, las ERO sirven como una molécula señalizadora intracelular, lo cual contribuye al proceso de activación de NF $\kappa$ B en respuesta directa a su estimulación. Por ello medimos el contenido de NF $\kappa$ B en la FN en los

diferentes tratamientos en ratas adultas y viejas. Sorprendentemente se encontró que los animales viejos llevan una mayor expresión de p65 y p50 en comparación al control (2 veces más,  $p < 0.05$ ) al ser pre-acondicionados con tBHQ (Figura 27). Paradójicamente, a los adultos bajo este mismo esquema de administración se encontró una expresión parcial en p50 (2 veces menos,  $p < 0.05$ ), con respecto a p65 que abate drásticamente su activación (casi 3 veces,  $p < 0.05$ ) en comparación a los animales seniles. En lo que respecta a los grupos tratados con tBHQ y 3NP, se observó que hay un patrón similar en las ratas adultas y viejas tanto para p65 como p50; aunque con 3NP los animales adultos son los que presentan la mayor expresión de NFκB con respecto al control, pues son estadísticamente significativos.



**Figura 27. Determinación del factor de transcripción NFκB en el cerebro de las ratas adultas y viejas tratadas con 3NP después del PreAc con tBHQ.** Los niveles de NFκB (subunidades p65 y p50) fueron determinados por Western blot en los diferentes tratamientos en ratas adultas y viejas. El análisis densitométrico fue normalizado con lámina para la fracción nuclear y actina para la fracción citosólica (como controles de carga) seguido de una segunda normalización considerando al grupo control como 1. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  3NP vs Ct, \* tBHQ+3NP vs tBHQ y 3NP, \* $p < 0.05$  3NP vs Ct.

## 9. DISCUSIÓN

Con el cambio en la pirámide poblacional y el aumento del número de adultos mayores, en los últimos años el estudio del envejecimiento ha tomado un papel central, ya que es un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades incluyendo diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Uno de los factores clave que se han propuesto como parte de la etiología de dichas patologías durante el envejecimiento es el estrés oxidante. En este sentido, la teoría del envejecimiento por radicales libres de Harman postula que la disminución en las funciones bioquímicas y fisiológicas asociadas al envejecimiento es debida al incremento en el daño oxidante acumulado a lo largo de la vida de los organismos (Harman, 1956).

Por otro lado, se sabe que durante el envejecimiento normal, el cerebro presenta una disminución en el estado de sus defensas antioxidantes, lo que ha llevado a proponer que los desórdenes cerebrales como Huntington, Parkinson y Alzheimer, entre otros, están caracterizados por tener un sistema antioxidante comprometido; lo cual implica el estudio de nuevas vías para su intervención basadas en tratamientos antioxidantes.

Para estudiar la relación del envejecimiento con las patologías antes mencionadas, se han usado moléculas que logren reproducir en su mayor parte sus características bioquímicas y fisiopatológicas. El estudio de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, es complicado debido a la diversidad de eventos que las pueden originar, entre los que destacan los procesos

genéticos, bioquímicos y ambientales, así como el tipo celular que se ve afectado en dichas patologías. Por eso, gran cantidad de estudios se han enfocado al daño a nivel neuronal, ya que la disfunción en la comunicación entre células es uno de los eventos más relevantes y característicos de dichas enfermedades. Puesto que la mitocondria es el sitio de mayor generación de ERO, se ha empleado a las toxinas mitocondriales con propiedades bioquímicas específicas para entender los mecanismos patogénicos de dichas condiciones clínicas.

En la presente tesis se propuso emplear al agente oxidante 3NP para mimetizar algunos de los cambios bioquímicos y conductuales que presentan las personas con Huntington, y en particular para generar daño oxidante en las células del cerebro. En este sentido, y con el fin de disminuir el daño oxidante producido por dicha neurotoxina, se intentó inducir la vía de protección antioxidante activando al factor de transcripción Nrf2, usando un inductor conocido de dicha vía tBHQ. Todo ello se realizó en un modelo de animal *in vivo* de ratas seniles y se comparó contra los efectos producidos en ratas adultas, puesto que hay muy poca información sobre el efecto protector de inductores de Nrf2 en organismos viejos.

Puesto que existen pocos trabajos realizados en animales adultos y casi ninguno en viejos, se determinaron las concentraciones y esquemas de tratamiento de los agentes químicos empleados. Ello se realizó en ratas adultas y una vez estandarizado, se empleó el mismo esquema en ratas viejas. La razón para ello es que es muy difícil y costoso tener a los animales viejos, por lo que solo se usaron para las determinaciones experimentales. De modo que para determinar la concentración a la cual tBHQ induce la translocación nuclear de Nrf2, se midió el

contenido de éste en las fracciones citosólica y nuclear, observando que la concentración de 100 mg/Kg tBHQ por 7 días es la ideal para llevar a cabo este efecto. Lo anterior concuerda con lo reportado por Abdel-Wahab, quien demostró que tBHQ fue capaz de revertir el daño oxidante causado por el 2'-CH<sub>3</sub>-MPTP, aunque los cambios histológicos lograron mitigarse ligeramente (Abdel-Wahab, 2005). Por otro lado, Saykally y colaboradores, en un modelo de daño cerebral traumático, al utilizar una concentración de 100 mg de tBHQ por 7 días, lograron mejorar la memoria visual después del daño, así como una reducción de caspasa-3 en hipocampo, logrando neuroprotección vía Nrf2 (Saykally, 2012). En cuanto al agente tóxico 3NP, observamos que no induce la translocación de Nrf2 al núcleo en el caso de las ratas adultas, pues como se sabe, múltiples residuos de cisteína permiten que Keap1 actúe como un "interruptor" molecular respondiendo a electrófilos/ERO con un cambio conformacional, liberando a Nrf2 para su translocación nuclear y la activación de la expresión génica de enzimas antioxidantes (Dinkova-Kostova, 2002; Itoh, 2003; Wakabayashi, 2004); no fue el caso para el esquema de administración de 3NP empleado. Esto a diferencia de lo que se ha reportado para otros agentes como la 3-hidroxikinurenina (3-HK), que puede modular la actividad proteica y antioxidante de Nrf2 en el estriado de rata, siendo la 3-HK una molécula que puede tener un papel dual en la célula, pudiendo ser tóxica o no (Colín-González, 2014). Por otra parte, la activación de Nrf2 previene la degeneración estriatal inducida por 3NP e incrementa marcadores de estrés en ratones (Yang, 2009). En este sentido, la inducción de la ruta Nrf2/ARE mejora el rendimiento motor, atenúa la degeneración del cuerpo estriado, así como el estrés oxidante, y aumenta la supervivencia en ratones transgénicos con EH (Stack, 2010).

De manera interesante, se encontró que las ratas viejas tratadas de manera independiente con tBHQ o con 3NP si inducen la translocación de Nrf2; este dato resulta interesante puesto que no hay información relevante que explique este efecto, por lo que podríamos sugerir que ambas moléculas modifican el estado redox. Por un lado, el 3NP produce estrés oxidante en el cerebro debido a múltiples mecanismos: 1) Disminución de ATP, despolarización de la membrana, incremento en la liberación de glutamato glial/neuronal, sobreactivación de los receptores ionotrópicos NMDA de glutamato, acumulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y una producción excesiva de ERO mitocondrial. 2) Activación secundaria de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como la sintasa de óxido nítrico (formación de peroxinitrito) y fosfolipasa A (producción de mediadores inflamatorios). 3) Liberación excesiva de dopamina, el cual puede generar  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando es metabolizado (Shih, 2005), sugiriendo que la inhibición metabólica por 3NP actuaría como una señal para llevar a cabo la activación de Nrf2. Por otro lado, tBHQ es el mayor metabolito del 3-tert-butilhidroxianizol (BHQ) (Nakamura, 2003), y tanto BHQ y tBHQ pueden jugar un papel pro-oxidante. Usando BHA (un antioxidante fenólico que rápidamente sufre una O-desalquilación por las isoenzimas de citocromo P450 para producir tBHQ (Verhagen, 1989), se ha demostrado que la hidroquinona se auto-oxida a tert-butylbenzoquinona (tBQ) y este metabolito está asociado con la generación de ERO. BHA en sí carece de propiedades para la activación del oxígeno (Kahl, 1989, Gharavi, 2007). Las secuencias de las reacciones en el ciclo redox de tBHQ con tBQ permiten la producción de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  posiblemente durante la activación metabólica de BHA (Abiko, 2011) (*Figura 12*). Con todo lo anterior, sugerimos que al generarse ERO, estas reacciones son las que llevarán a cabo las modificaciones en el estado redox,

y por tanto la disociación del complejo Keap1/Nrf2 con la subsecuente translocación nuclear de Nrf2. Lo interesante es que al ver el efecto conductual, así como la histología de los cerebros, se aprecia que tBHQ genera un efecto protector, mientras que 3NP tiene un efecto dañino, lo cual nos sugiere que la activación de Nrf2 y la subsecuente vía de protección si debió de inducirse de manera efectiva en el caso de tBHQ, no así en el de 3NP, donde posiblemente el cambio en el estado redox no fue a niveles que pudieran ser regulados por las células, sino más bien generadores de estrés oxidante y daño.

Un mecanismo importante de protección es mediante el PreT con diversos inductores antes de producir un daño a la célula, lo cual en nuestro modelo de estudio consistió en la administración de tBHQ previo al tratamiento con 3NP. Al realizar este tratamiento en ratas adultas y viejas, observamos datos interesantes, puesto que las ratas viejas lograron activar a Nrf2; estos datos dan seguimiento a lo reportado por nuestro grupo de trabajo en donde en un modelo *in vitro* de astrocitos provenientes de ratas seniles, al ser pre-tratadas con tBHQ, éstas lograron activar la vía Nrf2 como mecanismo de protección ante del daño producido por el toxico MPP<sup>+</sup> (Alarcón-Aguilar, 2014). Datos similares han sido reportados por Tasset y colaboradores, quienes demostraron que tBHQ fue capaz de inducir la acumulación nuclear de Nrf2, y por tanto la protección celular en un modelo de toxicidad generado por el ácido quinolínico (QUIN); mientras que el QUIN *per se* disminuyó los niveles de Nrf2, en contraparte un tratamiento con tBHQ preservó los niveles nucleares de Nrf2 en presencia de QUIN (Tasset, 2010).

Como se ha mencionado, la respuesta antioxidante juega un papel fundamental en los procesos de protección ante la prevalencia de condiciones oxidantes en la célula. Se ha documentado que en diferentes modelos las enzimas antioxidantes moduladas por Nrf2 dan como resultado sobrevivencia celular. Entre dichos estudios podemos mencionar los datos publicados por Correa y colaboradores, en el que demostramos que el PreT con curcumina (120 mg/Kg vía oral por 7 días) antes de la nefrectomía y después de la cirugía por 60 días, ejerce cardioprotección en un modelo de rata con nefrectomía subtotal (5/6) al tener un aumento en CAT, SOD y GST, incrementando la respuesta antioxidante (Correa, 2013). Es por ello que se esperaba que al activarse Nrf2 se encontraran niveles aumentados en las enzimas antioxidantes reguladas por éste factor. Al medir HO-1, GST y SOD-Cu/Zn en ratas adultas, observamos que después del tratamiento con tBHQ las tres presentaban niveles semejantes con respecto al control; estos datos se asemejan a los obtenidos en los animales viejos tratados con tBHQ. Después del tratamiento con 3NP se observó que HO-1, GST y SOD Cu/Zn son semejantes en ratas adultas, mientras que para las ratas viejas solo la GST y SOD Cu/Zn se encuentran disminuidas 30% con respecto al control. De manera sorpresiva, al realizar el PreAc con tBHQ, solo las ratas viejas logran incrementar su sistema antioxidante, a excepción de la GST que está por debajo del control. En cambio, en las ratas adultas se observan cambios significativos en las tres enzimas medidas en todos los tratamientos, surgiendo la siguiente pregunta ¿por qué los animales adultos no logran aumentar su batería antioxidante? Aunque no tenemos una respuesta clara para este efecto, nuestros resultados parcialmente concuerdan con lo reportado por Lee y colaboradores, quienes demostraron que en el PreAc con ejercicio, los niveles

de SOD-Cu/Zn y SOD-Mn se encuentran reducidas en un modelo de lesión renal isquémica aguda (Lee, 2013), en contraste a lo reportado por Liu, en donde el PreAc con quercetina (QC) disminuyó el estrés oxidante al aumentar las enzimas antioxidantes como GSH, SOD, CAT, GPx y GR en un modelo de isquemia-reperfusión en corazón (Liu, 2014). Datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que al realizar una CDR de tBHQ llevada a cabo en astrocitos primarios de rata, la supervivencia cambia dependiendo de la edad del animal donante; en este sentido, se observó que con un tratamiento de 10 a 25 mM de tBHQ por 24 horas, los astrocitos de animales neonatos, adultos y viejos sobrevivían, mientras que el 50% de astrocitos derivados de animales adultos morían después del tratamiento con 50 mM de tBHQ. Al PreAc con tBHQ a 25 mM, se generaban dos condiciones: por un lado, la activación de Nrf2 como vía de supervivencia, y por el otro, generar una respuesta de hormesis oxidativa condicionada (HOC) y obtener así protección contra un insulto altamente oxidante inducido por MPP<sup>+</sup>, una molécula neurotóxica (Alarcón-Aguilar, 2014; Luna-López, 2014).

Un resultado interesante fue el encontrar que después del PreAc con tBHQ se observó una recuperación en el peso corporal de las ratas viejas. Con respecto a la conducta motora se ve que disminuye después del tratamiento con 3NP en ambos grupos de animales, sugiriendo un efecto hipocinético, lo cual significaría que el efecto de este agente tóxico reproduce algunos de los cambios tardíos observados en la EH, tal y como lo han reportado varios grupos de trabajo (Koutouzis, 1994b; Shear, 1998; Pérez-De la Cruz, 2009). Al llevar a cabo el PreAc con tBHQ, la conducta motora logra recuperarse a niveles del control, y de manera interesante, el efecto

*per se* de tBHQ presenta un patrón hipercinético sin que ello represente daño. Este último dato se corroboró al analizar detalles morfológicos del cuerpo estriado de ratas adultas y viejas, observando que tBHQ no modifica la citoarquitectura de ambos grupos, presentando una morfología similar al control. Aunado a ello, nuestros datos correlacionan con el conteo de células vivas y muertas, demostrando que tBHQ presenta entre el 10-15% de células muertas. Ello, comparado con el grupo tratado con 3NP, donde se aprecia que a nivel histológico y en el análisis cuantitativo, hay un aumento del 60% de células muertas comparadas con el control y tBHQ. En tanto, después del PreAc con tBHQ, dicho efecto disminuye de manera importante, apreciándose niveles similares al grupo control. Nuestros datos resultan interesantes ya que se observa una clara protección en las ratas viejas, aunque no necesariamente correlacione con un incremento en las enzimas estudiadas en este trabajo con respecto a los animales adultos. La relevancia de ello radica en que la mayoría de los datos publicados por diversos grupos de trabajo donde utilizan inductores de Nrf2 para observar protección han sido realizados en ratas adultas. Por ejemplo, Colín y colaboradores demostraron que al administrar extracto de ajo envejecido, disminuyeron las alteraciones neurológicas, el tamaño del infarto, y de manera importante el daño histológico (37.7%) inducido por la isquemia cerebral, otorgándole propiedades antioxidantes (Colín-González, 2011).

Por otro lado, el incremento en la gliosis reactiva durante el envejecimiento, en conjunto con un incremento en la producción de ERO y una disminución en el contenido antioxidante en el cerebro (Kanwar, 2007), son las características principales en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la

edad (Alarcón-Aguilar, 2014). En este sentido, se evaluó la astrogliosis en todos los tratamientos en las ratas adultas y viejas. Los resultados muestran un patrón importante de gliosis reactiva en el grupo de ratas viejas, pues en todos los grupos, incluyendo los controles, se aprecia un aumento en el número de células inmunopositivas a la GFAP, siendo este un patrón *per se* en los animales seniles, en contraste con los adultos. Un hecho interesante es que el PreAc con tBHQ disminuye el número de células positivas a la GFAP después del daño producido por 3NP (3 veces menos), lo cual resulta controversial con otros reportes donde señalan que tBHQ no logra disminuir los cambios morfológicos y la gliosis de neuronas dopaminérgicas del estriado (Abdel-Wahab, 2005).

Por otra parte, en los animales adultos se encontraron algunos efectos contrarios a los animales viejos, pues el efecto del tBHQ *per se* resultó en el aumento de la gliosis reactiva, incluso superior al producido por 3NP; después del PreAc no se logra disminuir la astrogliosis, lo cual nos lleva a formular la siguiente interrogante ¿Por qué tBHQ aumenta los niveles de gliosis reactiva en ratas adultas mientras que en viejas ejerce protección? Como sabemos la astrogliosis es un proceso que involucra cambios morfológicos y bioquímicos asociados con la activación de astrocitos en respuesta al daño celular del cerebro (Theodoric, 2012); basándonos en esta definición, podríamos sugerir que tBHQ estaría cumpliendo su papel pro-oxidante, por lo que este efecto se traduciría como daño a nivel celular, aumentando la activación de los astrocitos. En este sentido, Jörgensen publicó que en animales silvestres los niveles endógenos de meteorina (proteína involucrada en diferenciación celular neuronal y glial) y CNTF (factor neurotrópico ciliar, proteína

con propiedades neurotrópicas) se incrementaron en las células gliales en respuesta a la lesión con QUIN, indicando que la meteorina podría ejercer sus efectos protectores como parte de la cascada de gliosis reactiva en el cerebro lesionado (Jørgensen, 2011), lo que nos llevaría a sugerir que la gliosis reactiva es importante como mecanismo de protección ante un daño cerebral. De esta manera, para el caso de las ratas adultas, tal vez lo que se observa es el inicio de un proceso pro-oxidante que pudiera terminar la protección.

El estado redox a nivel celular juega un papel crucial como mediador en los mecanismos de activación de diversos factores de transcripción como NFκB (Jang, 2004), AP-1 (Galter, 1994) y Nrf2 (Wakabayashi, 2004). En nuestro modelo, observamos que en las ratas viejas y adultas, al ser tratadas con 3NP, se disminuye el cociente de GSH/GSSG con respecto al Ct, incluso en comparación al grupo tratado con tBHQ que no se modifica. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura usando otros agentes tóxicos como MPP<sup>+</sup> y LPS, entre otros (Alarcón-Aguilar, 2014; Fan, 2008; García-Nogales, 1999). Al PreAc con tBHQ, los animales adultos y viejos lograron mejorar el estado redox con respecto al grupo tratado con 3NP, observándose un incremento en el estado redox, sugiriendo dos panoramas: por un lado, un cociente en donde prevalecen los niveles de GSH, trayendo consigo una disminución de GSSG; y por el otro, la promoción de la síntesis de GSH.

También se midió la oxidación de proteínas como marcador de daño oxidante, y el 3NP aumentó la oxidación de proteínas tanto en adultos como en viejos, causando entre otros efectos la muerte celular. Varios estudios han mostrado que hay

incremento en los niveles de proteínas carboniladas relacionadas a la edad en humanos (Voss, 2006; Jacob, 2013), particularmente en corazón, músculo, cerebro y plasma (Stadtman, 2001; Floyd, 2002; Gianni, 2004). Apoyando este concepto, en nuestro grupo de trabajo se demostró que los astrocitos provenientes de ratas adultas son más susceptibles al daño por MPP<sup>+</sup> al aumentar los niveles de proteínas oxidadas (Alarcón-Aguilar, 2014). Al ser PreAc con tBHQ, parcialmente se logró disminuir el daño a nivel de proteínas, sugiriendo que la protección es vía Nrf2.

La disfunción mitocondrial es central para la teoría del envejecimiento, ya que se propone que los cambios de la mitocondria relacionados a la edad pueden alterar las funciones fisiológicas celulares, contribuyendo al desarrollo de enfermedades relacionadas a la edad, como las cardíacas y cerebrales. Se sabe que estos daños mitocondriales estimulan la señalización para la biogénesis mitocondrial; en este sentido se ha propuesto una importante activación del regulador maestro PGC1 $\alpha$ , y sus factores de transcripción río abajo (Dai, 2012). En este sentido, recientes trabajos sugieren que el mantenimiento de la función mitocondrial es benéfico en algunas enfermedades relacionadas a la edad (Guarente, 2008; Wenz, 2011). Además, se ha propuesto una relación estrecha la disminución de los niveles de PGC1 $\alpha$  y la reducción en la función mitocondrial asociada con el envejecimiento, considerando que la mitocondria es el organelo más dañado durante esta etapa; por lo tanto el PGC1 $\alpha$  ha sido implicado en el comienzo y la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Wenz, 2011).

Es por ello que resultó interesante determinar si habría señales de biogénesis mitocondrial en las ratas viejas y adultas como respuesta al PreAc con tBHQ,

determinando el contenido de PGC1 $\alpha$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido del regulador maestro de la biogénesis mitocondrial con cada uno de los tratamientos. Confirmando que la biogénesis mitocondrial se encuentra disminuida durante el envejecimiento, lo cual se asocia a la disfunción mitocondrial; sin embargo, surge la interrogante de porque en animales adultos no se activa la vía de la biogénesis mitocondrial. Nuestros datos son interesantes, pues se ha demostrado que en corazones envejecidos hay un incremento en el número de copias del DNA mitocondrial (mtDNA) correlacionadas con la sobrerregulación de PGC1 $\alpha$  (Dai, 2009). Aunque la activación de PGC1 $\alpha$  puede tener efectos benéficos en el envejecimiento en condiciones patológicas que afectan a tejidos como el corazón, músculo esquelético y cerebro (Ma, 2014), nuestros datos no concuerdan con lo reportado en la literatura.

En la búsqueda de otras vías de protección que pudieran activarse por el PreAc con tBHQ de manera simultánea o incluso alternativa al factor Nrf2, se decidió evaluar otro factor de transcripción que también se activa por el mismo principio de cambios en el estado redox; es decir, el factor de transcripción NF $\kappa$ B. Al evaluar las subunidades p65 y p50 de NF $\kappa$ B, se encontraron datos sumamente interesantes, pues al PreAc a las ratas viejas con tBHQ se observa una activación de este factor de transcripción (2 veces más con respecto al control), al contrario de las ratas adultas, en las cuales se aprecia que la subunidad p65 se ve disminuida, incluso por debajo del no tratado. Estudios previos tanto en humanos como en modelos animales han demostrado que algunas moléculas que también activan a NF $\kappa$ B, como las citocinas, se encuentran alteradas en edades avanzadas y propician la

expresión de genes pro-inflamatorios (Ungvari, 2010), puesto que este factor de transcripción está implicado en la activación endotelial y cambios inflamatorios en humanos seniles (Muzumdar, 2009). Otro tejido que tiene una alta tasa metabólica en donde se ha determinado que NFκB disminuye la respuesta inflamatoria de bajo grado en modelos de animales seniles es el corazón (Ungvari, 2007; Ungvari, 2010). Por ello, indirectamente podríamos sugerir que NFκB podría tener un papel parecido tanto en cerebro como en el sistema cardiovascular; tomando en cuenta que ambos tejidos son altamente metabólicos, poseen gran cantidad de mitocondrias y alto consumo de oxígeno. Con todo lo anterior, podríamos establecer que el envejecimiento está asociado con la falla endógena de los mecanismos de defensa antioxidante modulados por Nrf2 que protegen al tejido contra el estrés oxidante sostenido, y la disminución de la actividad de Nrf2/ARE en el organismo senil contribuye a incrementar el estrés oxidante exacerbando la activación de NFκB en el cerebro.

## 10. CONCLUSIONES

1. El agente oxidante 3NP en el esquema de administración empleado, reprodujo el modelo de daño, mimetizando algunas de las características bioquímicas y fisiológicas presentadas en la enfermedad de Huntington, en particular la disminución de peso corporal, el daño histológico del cuerpo estriado, aumento en la gliosis reactiva e hipoactividad en la conducta motora; este daño se revirtió al PreAc con tBHQ. prueba de motilidad.
2. Se determinó que el PreT con tBHQ logra activar al factor de transcripción Nrf2 en las ratas viejas y genera una protección contra el daño producido por 3NP, en particular en cuanto al aumento en la GST, la recuperación del peso corporal, la histología del cuerpo estriado y la conducta motora, no así en el incremento de las enzimas HO-1 y SODCu/Zn.
3. De manera interesante, el tBHQ *per se* causa un aumento en la astrogliosis en ratas adultas; además el PreAc con tBHQ no disminuyó este daño.
4. En la medición del estado redox se observó que después del PreAc con tBHQ las ratas adultas y viejas incrementan el cociente de GSH/GSSG en comparación al grupo tratado con 3NP. Los resultados para la carbonilación de proteínas indican que tanto en los animales adultos y viejos, el PreAc con tBHQ protegió parcialmente del daño producido por 3NP.

5. No se observaron cambios en los niveles de la proteína PGC1-alfa en relación a la biogénesis mitocondrial en los animales adultos y viejos en ninguno de los tratamientos realizados
6. Se encontró un aumento significativo del factor de transcripción NFκB en las ratas adultas y viejas después del PreAc, aunque fue mayor el efecto observado en los animales viejos.

Los mecanismos propuestos en la activación de Nrf2 en el modelo del PreAc con tBHQ se enlistan a continuación (*Figura 28*): 1) La disfunción mitocondrial provocada por la inhibición de la SDH en presencia del 3NP es representada por la disminución de ATP y el aumento en la producción de ERO, causando neurodegeneración por la muerte de las células GABAérgicas presentes en el núcleo estriado y aumento en la gliosis reactiva. 2) tBHQ, al ser biotransformado, juega un papel dual (antioxidante/pro-oxidante) debido a la generación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (círculos verdes y rojos, respectivamente), quienes indirectamente permitirán la translocación nuclear de Nrf2 de manera dependiente de Keap1. 3) Nrf2 unido a su secuencia ARE/EpRE permitirá la transcripción de genes de enzimas antioxidantes como SOD, GST, HO-1 que en animales seniles están aumentadas en su contenido proteico al estar PreAc con tBHQ. 4) Se favorece la neuroprotección al disminuir las ERO producidas por la inhibición de la SDH (por el efecto directo de 3NP). 5) Se ha propuesto que PKC indirectamente favorecido por la ERO, permite la fosforilación de Nrf2 en residuos de Ser40, translocándola al núcleo. 6) El factor de transcripción NFκB también puede activarse a través de los cambios en el estado redox; así también, podría estar actuando de manera simultánea a Nrf2, pues los

animales seniles activan la vía NFκB al PreAc con tBHQ. Sin embargo, las ERO producidas por el inductor podrían estar modulando este efecto, culminando en la disminución de la inflamación (como un evento secundario del aumento en la astrogliosis) confiriendo neuroprotección. SDH: Succinato deshidrogenasa; 3NP: ácido 3-nitropropionico; ATP: Adenosin trifosfato, ERO: Especies Reactivas de Oxígeno; tBHQ: tert-butilhidroquinona; ARE/EpRE: Elemento de Respuesta Antioxidante/Elemento de Respuesta a Electrófilos; PKC: Proteína Cinasa C; SOD: Superóxido dismutasa; GST: Glutación-S-transferasa; HO-1: Hemooxigenasa-1; PreAc: Preacondicionamiento; P: Fosforilación.

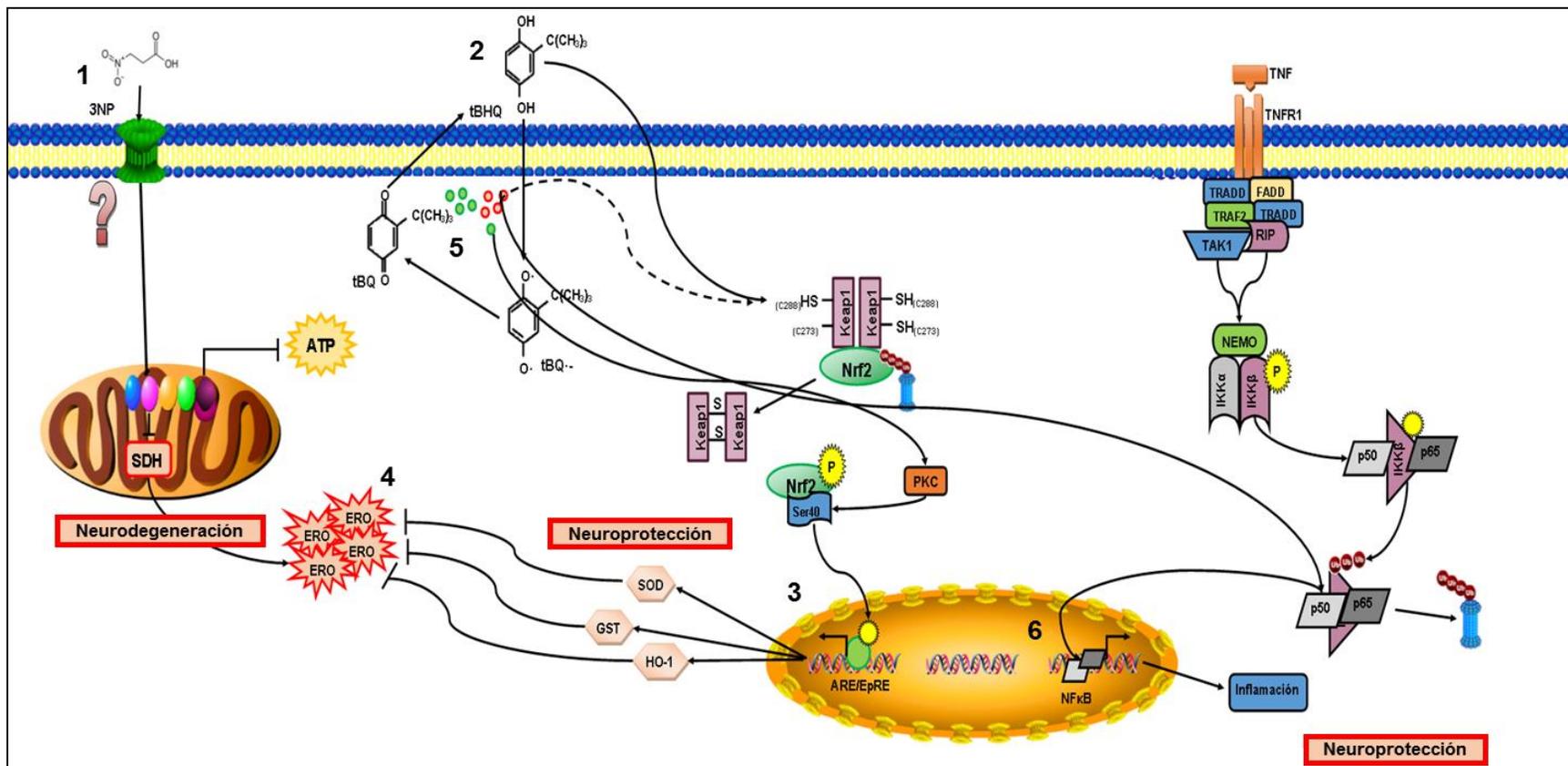


Figura 28. Mecanismos propuestos en la activación de Nrf2 en el modelo de PreAc con tBHQ.

## 11. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el daño oxidativo producido por 3NP en animales seniles mediante la detección de EROs *in situ*, la lipoperoxidación y las actividades de las enzimas antioxidantes moduladas por Nrf2 (GST, SOD,  $\gamma$ GCS, GPx).
2. Evaluar la actividad de la SDH en animales seniles y la protección conferida por tBHQ.
3. Evaluar las vías de señalización PKC, ERK1/2 y PI3K/Akt, implicadas en la activación de Nrf2 y su posible papel protector en animales seniles.
4. Medir la activación de Nrf2 y NF $\kappa$ B en animales seniles bajo el tratamiento con tBHQ por el ensayo EMSA.
5. Evaluar el papel de Keap1 en citosol y núcleo, como principal regulador de Nrf2, en animales seniles.
6. Evaluar otros marcadores de biogénesis mitocondrial (fusión y fisión mitocondrial) en animales de 24 meses.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Wahab MH. **Potential neuroprotective effect of t-butylhydroquinone against neurotoxicity-induced by 1-methyl-4-(2'-methylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'-methyl-MPTP) in mice.** *J Biochem Mol Toxicol.* (2005) 19(1):32-41.

Abiko Y, Miura T, Phuc BH, Shinkai Y, Kumagai Y. **Participation of covalent modification of Keap1 in the activation of Nrf2 by tert-butylbenzoquinone, an electrophilic metabolite of butylated hydroxyanisole.** *Toxicol Appl Pharmacol.* (2011) 255(1):32-9. doi: 10.1016/j.taap.2011.05.013.

Ahmed AE, Nouraldeem AM, Abdel-Rahman SZ, Rajaraman S. **Role of glutathione modulation in acrylonitrile-induced gastric DNA damage in rats.** *Arch Toxicol.* (1996) 70(10):620-7.

Alarcón-Aguilar A, González-Puertos VY, Luna-López A, López-Macay A, Morán J, Santamaría A, Königsberg M. **Comparing the effects of two neurotoxins in cortical astrocytes obtained from rats of different ages: involvement of oxidative damage.** *J Appl Toxicol.* (2014) 34(2):127-38. Doi: 10.1002/jat.2841.

Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Ventura-Gallegos JL, Lazzarini R, Galván-Arzate S, González-Puertos VY, Morán J, Santamaría A, Königsberg M. **Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment.** *Neurobiol Aging.* (2014) 35(8):1901-12. Doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143.

Alexi T, Hughes PE, Faull RL, Williams CE. **3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration.** *Neuroreport.* (1998) 9(11):R57-64.

Anderson R, Prolla T. **PGC-1alpha in aging and anti-aging interventions.** *Biochim Biophys Acta.* (2009) 1790(10):1059-66. Doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.005.

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

Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W. **Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?** *Trends Neurosci.* (1993) 16(4):125-31.

Beal MF, Ferrante RJ. **Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease.** *Nat Rev Neurosci.* (2004) 5(5):373-84.

Beckman KB, Ames BN. **The free radical theory of aging matures.** *Physiol Rev.* (1998) 78(2):547-81.

Bezzi P, Volterra A. **A neuron-glia signalling network in the active brain.** *Curr Opin Neurobiol.* (2001) 11(3):387-94.

Borlongan CV, Koutouzis TK, Randall TS, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. **Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats.** *Brain Res Bull.* (1995a) 36(6):549-56.

Borlongan CV, Koutouzis TK, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. **Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease.** *Brain Res.* (1995b) 697(1-2):254-7.

Borlongan CV, Koutouzis TK, Freeman TB, Hauser RA, Cahill DW, Sanberg PR. **Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model.** *Brain Res Brain Res Protoc.* (1997a) 1(3):253-7.

Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR. **3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease.** *Neurosci Biobehav Rev.* (1997b) 21(3):289-93.

Bossi SR, Simpson JR, Isacson O. **Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction.** *Neuroreport.* (1993) 4(1):73-6.

Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* (1976) 72:248-54.

Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. **Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals.** *Prog Neurobiol.* (1999) 59(5):427-68.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. **3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease.** *J Neurochem.* 2005 95(6):1521-40.

Buelna-Chontal M, Zazueta C. **Redox activation of Nrf2 & NF- $\kappa$ B: a double end sword?** *Cell Signal.* (2013) 25(12):2548-57. Doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.007.

Chaturvedi RK, Beal MF. **Mitochondrial disease of the brain.** *Free Radic Biol Med.* (2013) 63:1-29. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018

Chandra A, Johri A, Beal MF. **Prospects for neuroprotective therapies in prodromal Huntington's disease.** *Mov Disord.* (2014) 29(3):285-93. Doi: 10.1002/mds.25835.

Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY, Kleeberger SR. **Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2002) 26(2):175-82.

Colín-González AL<sup>1</sup>, Ortiz-Plata A, Villeda-Hernández J, Barrera D, Molina-Jijón E, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD. **Aged garlic extract attenuates cerebral damage and cyclooxygenase-2 induction after ischemia and reperfusion in rats.** *Plant Foods Hum Nutr.* (2011) 66(4):348-54. Doi: 10.1007/s11130-011-0251-3.

Colín-González AL, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas ME, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Barrera-Oviedo D, Maldonado PD. **Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative damage induced in an excitotoxic/pro-oxidant model in the rat striatum.** *Neuroscience.* (2013) 231:91-101. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.031.

Colín-González AL, Maya-López M, Pedraza-Chaverri J, Ali SF, Chavarría A, Santamaría A. **The Janus faces of 3-hydroxykynurenine: Dual redox modulatory activity and lack of neurotoxicity in the rat striatum.** *Brain Res.* (2014) pii: S0006-8993(14)01256-6. Doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.034.

Correa F, Buelna-Chontal M, Hernández-Reséndiz S, R García-Niño W, J Roldán F, Soto V, Silva-Palacios A, Amador A, Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Zazueta C. **Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease.** *Free Radic Biol Med.* (2013) 61C:119-129. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.017.

Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. **Transcriptional repression of PGC1-alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration.** (2006) *Cell* 127(1):59-69

Dai DF, Santana LF, Vermulst M, Tomazela DM, Emond MJ, MacCoss MJ, Gollahon K, Martin GM, Loeb LA, Ladiges WC, Rabinovitch PS. **Overexpression of catalase**

**targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging.** *Circulation.* (2009) 119(21):2789-97. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.822403. Epub 2009 May 18.

Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. **Mitochondria and cardiovascular aging.** *Circ Res.* (2012) 110(8):1109-24. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246140

De Oca Balderas PM, Ospina GG, Del Ángel AS. **Mitochondrial impairment induced by 3-nitropropionic acid is enhanced by endogenous metalloprotease activityinhibition incultured rat striatal neurons.***Neurosci Lett.* (2013) 546:16-20. Doi: 10.1016/j.neulet.2013.04.041.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N. **Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain.** *Science.* (1997) 277(5334):1990-3.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. **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 USA.* (2002) 99(18):11908-13.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. **Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins.** *Mol Nutr Food Res.* (2008) 52(1):S128-38. Doi: 10.1002/mnfr.200700195.

Dinkova-Kostova AT, Wang XJ. **Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols.** *Chem Biol Interact.* (2011) 192(1-2):101-6. Doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.010.

Dominguez-Gerpe L, Araújo-Vilar D. **Prematurely aged children: molecular alterations leading to Hutchinson-Gilford progeria and Werner syndromes.** *Curr Aging Sci.* (2008) 1(3):202-12.

Eskenazi BR, Wilson-Rich NS, Starks PT. **A Darwinian approach to Huntington's disease: subtle health benefits of a neurological disorder.** *Med Hypotheses.* (2007) 69(6):1183-9.

Fariss MW, Reed DJ. **High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives.** *Methods Enzymol.* (1987) 143:101-9.

Fan LW, Mitchell HJ, Tien LT, Zheng B, Pang Y, Rhodies PG, Cai Z. **Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone reduces lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain.** *Dev Neurobiol* (2008) 68(3):365-78

Floyd RA, Hensley K. **Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases.** *Neurobiol Aging*. (2002) 23(5):795–807.

Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. **Redox signaling: Thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers.** *Am J Physiol Cell Physiol*. (2004) 287(2):C246-56.

Friedlander R. **Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases.** *N Engl J Med*. (2003) 348(14):1365-1375.

Funayama R, Ishiwaka F. **Cellular senescence and chromatin structure.** *Chromosome* (2007) 116(5):431-440

Fujita K, Yamafuji M, Nakabeppu Y, Noda M. **Therapeutic approach to neurodegenerative diseases by medical gases: focusing on redox signaling and related antioxidant enzymes.** *Oxid Med Cell Longev*. (2012) 2012:324256. Doi: 10.1155/2012/324256.

Galter S, Mihm S, Dröge W. **Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors kB and the activator protein-1.** *Eur. J. Biochem*. (1994) 221: 639-648.

Gao X, Talalay P. **Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage.** *Proc Natl Acad Sci USA*. (2004) 101(28):10446-51.

García-Nogales P, Almeida A, Fernández E, Medina JM, Bolaños JP. **Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes.** *J Neurochem* (1999) 72(4):1750-1758

Gharavi N, Haggarty S, El-Kadi AO. **Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites.** *Curr Drug Metab*. (2007) 8(1):1-7.

Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. **Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle.** *Exp Gerontol*. (2004) 39(9):1391–1400

Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. **Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis.** *J Biol Chem.* (2008) 283(21):14581-9. Doi: 10.1074/jbc.M707733200.

Gong P, Stewart D, Hu B, Li N, Cook J, Nel A, Alam J. **Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2.** *Antioxid Redox Signal.* (2002) 4(2):249-57.

Guarente L. **Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?** *Cell.* (2008) 132(2):171-6. Doi: 10.1016/j.cell.2008.01.007.

Gubellini P, Picconi B, Di Filippo M, Calabresi P. **Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: From experimental models to neurodegenerative disease.** *Biochim Biophys Acta.* (2010) 1802(1):151-61. Doi: 10.1016/j.bbadis.2009.08.001

Guía para el cuidado y so de los animales de laboratorio. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina, 1999.

Harman D. **Aging: A theory based of free radical and radiation chemistry.** *J Gerontol.* (1956) 11(3):298-300.

Harman D. **The aging process.** *Proc Natl Acad Sci USA.* (1981). 78(11):7124-8.

Harman D. **Free radical theory of aging.** *Mutat Res.* (1992) 275(3-6):257-66.

Harman D. **Aging and oxidative stress.** *J Int Fed Clin Chem.* (1998) 10(1):24-27.

Hwang E, Yoon G y Kang H. **A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging.** *Cell Mol Life Sci.* (2009) 66(15):2503-2524. Doi: 10.1007/s00018-009-0034-2

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. **An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements.** *Biochem Biophys Res Commun.* (1997) 236(2):313-22.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. **Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2**

through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* (1999) 13(1):76-86.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. **Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles.** *Genes Cells.* (2003) 8(4):379-91.

Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, Yamamoto M. **Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2).** *Mol Cell Biol.* (2004) 24(1):36-45.

Jacob KD1, Noren Hooten N, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* (2013) 134(3-4):139-57. Doi: 10.1016/j.mad.2013.02.008.

Jaiswal AK. **Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression.** *Free Radic Biol Med.* (2004) 36(10):1199-207.

Jang JH, Surh YJ. **Bcl-2 attenuation of oxidative cell death is associated with up-regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase via constitutive NF $\kappa$ B activation.** *J Biol Chem.* (2004) 279:38779-38786.

Jones DP. **Radical-free biology of oxidative stress.** *Am J Physiol Cell Physiol.* (2008) 295(4):C849-68. Doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008.

Jørgensen JR1, Emerich DF, Thanos C, Thompson LH, Torp M, Bintz B, Fjord-Larsen L, Johansen TE, Wahlberg LU. **Lentiviral delivery of meteorin protects striatal neurons against excitotoxicity and reverses motor deficits in the quinolinic acid rat model.** *Neurobiol Dis.* (2011) 41(1):160-8. doi: 10.1016/j.nbd.2010.09.003

Kahl R, Weinke S, Kappus H. **Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole.** *Toxicology.* (1989) 59(2):179-94.

Kanwar SS, Nehru B. **Modulatory effects of N-acetylcysteine on cerebral cortex and cerebellum regions of ageing rat brain.** *Nutr Hosp.* (2007) 22(1):95-100.

Kedar NP. **Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease?** *J Postgrad Med.* (2003) 49(3):236-45.

Kettenmann H, Ransom BR. **Neuroglia**. Oxford University Press, Oxford/New York (1995) ISBN 0-19-507847-0

Kirkwood TB. **Comparative life spans of species: why do species have the life spans they do?** *Am J Clin Nutr.* (1992) 55(6):1191S-1195S.

Koh K, Cha Y, Kim S, Kim J. **tBHQ inhibits LPS-induced microglial activation via Nrf2-mediated suppression of p38 phosphorylation.** *Biochem Biophys Res Commun.* (2009) 380(3):449-53. Doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.082.

Königsberg M. **Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas.** Ed. E.M. Moderno (2008) México. 623.

Koutouzis TK, Borlongan CV, Scorcio T, Creese I, Cahill DW, Freeman TB, Sanberg PR. **Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects on locomotor behavior.** *Brain Res.* (1994b) 646(2):242-6.

Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. **Functional neuroanatomy of the basal ganglia.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* (2012) 2(12):a009621 Doi: 10.1101/cshperspect.a009621.

Lee JM, Shih AY, Murphy TH, Johnson JA. **NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons.** *J Biol Chem.* 2003 278(39):37948-56.

Lee J, Park S, Kim WK. **Exercise preconditioning reduces acute ischemic renal injury in Hsp70.1 knockout mouse.** *Histol Histopathol.* (2013) 28(9):1223-33.

Lenz G, Manozzo L, Gottardo S, Achaval M, Salbego C, Rodnight R. **Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunoccontent of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after kainic acid-induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis.** *Brain Res.* (1997) 764(1-2):188-96.

Liang H, Ward WF. **PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism.** *Adv Physiol Educ.* (2006) 30(4):145-51.

Liu H, Guo X, Chu Y, Lu S. **Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats.** *Gene.* (2014) 15;545(1):149-55. Doi: 10.1016/j.gene.2014.04.043.

López-Muñoz E, Torres-Carrillo, N (Coord). **Aspectos moleculares del envejecimiento**. México: Instituto de Geriatria. (2012)

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. **The hallmarks of aging**. *Cell* (2013) 153(6):1194-217. Doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. **3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin**. *Can J Neurol Sci.* (1991) 18(4):492-8.

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. **Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts**. *Free Radic Biol Med.* (2010) 49(7):1192-204. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.004.

Luna-López A, González-Puertos VY, López-Diazguerrero NE, Königsberg M. **New considerations on hormetic response against oxidative stress**. *J Cell Commun Signal.* (2014) Doi:10.1007/s12079-014-0248-4

Ma X, Xu L, Gavrilova O, Mueller E. **Role of forkhead box protein A3 in age-associated metabolic decline**. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111(39):14289-94. doi: 10.1073/pnas.1407640111.

Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. **Energy on demand**. *Science.* (1999) 283(5401):496-7.

Martínez-Sámano J, Torres-Duran PV, Juárez-Oropeza MA. **El glutati6n y su asociaci6n con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral**. *Rev* (2011) 30(2):56-67

McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. **Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex**. *J Biol Chem.* (2006) 281(34):24756-68.

Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, Buettner C, Cobb LJ, Fishman S, Budagov T, Cui L, Einstein FH, Poduval A, Hwang D, Barzilai N, Cohen P. **Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action**. *PLoS One.* (2009) 4(7):e6334. Doi: 10.1371/journal.pone.0006334.

Nakamura Y, Kumagai T, Yoshida C, Naito Y, Miyamoto M, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. **Pivotal role of electrophilicity in glutathione S-transferase induction by tert-butylhydroquinone.** *Biochemistry.* (2003) 42(14):4300-9.

Napolitano M, Zei D, Centonze D, Palermo R, Bernardi G, Vacca A, Calabresi P, Gulino A. **NF-kB/NOS cross-talk induced by mitochondrial complex II inhibition: implications for Huntington's disease.** *Neurosci Lett.* (2008) 434(3):241-6. Doi: 10.1016/j.neulet.2007.09.056.

Nishizono S, Hayami T, Ikeda I, Imaizumi K. **Protection against the diabetogenic effect of feeding tert-butylhydroquinone to rats prior to the administration of streptozotocin.** *Biosci Biotechnol Biochem.* (2000) 64(6):1153-8.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Pardo-Andreu G, Delgado-Hernández R. **Senescencia y envejecimiento.** *Rev Cubana Invest Biomed.* (2003) 22(3):204-212

Patel VP, Defranco DB, Chu CT. **Altered transcription factor trafficking in oxidatively-stressed neuronal cells.** *Biochim Biophys Acta.* (2012) 1822(11):1773-82. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.08.002.

Pérez-De La Cruz V, Santamaría. **Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence.** *Physiol Res.* (2007) 56(5):513-26.

Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverrí J, Ali SF, Santamaría A. **Targeting oxidative/nitrogenic stress ameliorates motor impairment, and attenuates synaptic mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in two models of Huntington's disease.** *Behav Brain Res.* (2009) 199(2):210-7. Doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.037.

Pérez V, Sierra F. **Biology of aging.** *Rev Med Chil* (2009) 127(2):296-302

Polidori MC. **Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases.** *J Postgrad Med.* (2003) 49(3):229-35.

Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR. **Choosing an animal model for the study of Huntington's disease.** *Nat Rev Neurosci.* (2013) 14(10):708-21 Doi: 10.1038/nrn3570.

Puigserver P, Spiegelman BM. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator.** *Endocr Rev.* (2003) 24(1):78-90.

Porchet R, Probst A, Bouras C, Dráberová E, Dráber P, Riederer BM. **Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease.** *Proteomics.* (2003) 3(8):1476-85.

Reddy PH, Mao P, Manczak M. **Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease.** *Brain Res Rev.* (2009) 61(1):33-48. Doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.04.001.

Reiner A, Dragatsis I, Dietrich P. **Genetics and neuropathology of Huntington's disease.** *Int Rev Neurobiol.* (2011) 98:325-72. doi:10.1016/B978-0-12-381328-2.00014-6.

Ross CA, Tabrizi SJ. **Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment.** *Lancet Neurol.* (2011) 10(1):83-98. Doi: 10.1016/S1474-4422(10)70245-3.

Satoh T, Okamoto SI, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, Tohyama K, Lipton SA. **Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers.** *Proc Natl Acad Sci USA.* (2006) 103(3):768-73.

Saykally JN, Rachmany L, Hatic H, Shaer A, Rubovitch V, Pick CG, Citron BA. **The nuclear factor erythroid 2-like 2 activator, tert-butylhydroquinone, improves cognitive performance in mice after mild traumatic brain injury.** *Neuroscience.* (2012) 223:305-14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.070.

Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL. **Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (1998) 22(7):1217-40.

Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. **Oxidative damage and mitochondrial decay in aging.** *Proc Natl Acad Sci USA.* (1994) 91(23):10771-8.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. **Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress.** *J Neurosci.* (2003) 23(8):3394-406.

Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH. **Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo.** *J Biol Chem.* (2005) 280(24):22925-36.

Shukitt-Hale B, Youdin K, Joseph J. **Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in basis science.** *Diagnostic and Intervention Word Scientific Publishing Singapore* (2003).

Spencer NF, Poynter ME, Im SY, Daynes RA. **Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging.** *Int Immunol.* (1997) 9(10):1581-8.

Stack C, Ho D, Wille E, Calingasan NY, Williams C, Liby K, Sporn M, Dumont M, Beal MF. **Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease.** *Free Radic Biol Med.* (2010) 49(2):147–158. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.017

Stadtman ER. **Protein oxidation in aging and age-related diseases.** *Ann N Y Acad Sci.* (2001) 928:22–38

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. **Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators.** *Cell.* (2006) 127(2):397-408.

Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, González-Herrera IG, Luna-López A, Königsberg M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Ali SF, Túnez I, Santamaría A. **Protective effect of tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: role of the Nrf2-antioxidant response element pathway.** *Neurosignals.* (2010) 18(1):24-31. Doi: 10.1159/000243650.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. **A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes.** *Cell.* (1993) 72(6):971-83.

Theodoric N, Bechberger JF, Naus CC, Sin WC. **Role of gap junction protein connexin43 in astrogliosis induced by brain injury.** *PLoS One.* (2012) 7(10):e47311. doi: 10.1371/journal.pone.0047311.

Timiras PS. **Physiological basis of aging and geriatrics.** *CRC Press* (2003) 4ta. Edición, 536 páginas.

Tollesfbol T. **Epigenetics of aging**. London: Springer, 2009.

Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M. **Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response**. *Mol Cell Biol*. (2007) 27(21):7511-21.

Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A. **3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: Past, present and future**. *Molecules*. (2010) 15(2):878-916. Doi: 10.3390/molecules15020878.

Ungvari ZI, Orosz Z, Labinskyy N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith KE, Csiszar A. **Increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production promotes endothelial NF-κB activation in aged rat arteries**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2007) 293(1):H37–H47.

Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. **Mechanisms of vascular aging: new perspectives**. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. (2010) 65(10):1028–1041 Doi: 10.1093/gerona/gdq113

Venkataraman K, Khurana S, Tai T. **Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind**. *Int. J. Mol. Sci*. (2013) 14(9):17897-17925. Doi: 10.3390/ijms140917897

Verhagen H, Furnée C, Schutte B, Hermans RJ, Bosman FT, Blijham GH, ten Hoor F, Henderson PT, Kleinjans JC. **Butylated hydroxyanisole-induced alterations in cell kinetic parameters in rat forestomach in relation to its oxidative cytochrome P-450-mediated metabolism**. *Carcinogenesis*. (1989) 10(10):1947-51.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. **Neuropathological classification of Huntington's disease**. *J Neuropathol Exp Neurol*. (1985) 44(6):559-77.

Voss P, Siems W. **Clinical oxidation parameters of aging**. *Free Radic Res*. (2006) 40(12):1339–1349.

Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. **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 USA*. (2004) 101(7):2040-5.

- Walker F. **Huntington's disease.** *Lancet.* (2007) 369(9557): 218-228.
- Wang XJ, Hayes JD, Higgins LG, Wolf CR, Dinkova-Kostova AT. **Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones.** *Chem Biol.* (2010) 17(1):75-85. Doi: 10.1016/j.chembiol.2009.12.013.
- Wenz T. **Mitochondria and PGC-1 $\alpha$  in Aging and Age-Associated Diseases.** *J Aging Res.* (2011) 2011:810619. Doi: 10.4061/2011/810619.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, Gilbert ML, Morton GJ, Bammler TK, Strand AD, Cui L, Beyer RP, Easley CN, Smith AC, Krainc D, Luquet S, Sweet IR, Schwartz MW, La Spada AR. **Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 $\alpha$  in Huntington's disease neurodegeneration.** *Cell Metab.* (2006) 4(5):349-62.
- Wheeler H. y Kim H. **Genetics and genomics of human ageing.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (2011) 366(1561):43-50. Doi: 10.1098/rstb.2010.0259
- Wise RA. **Dopamine learning and motivation.** *Nat Rev Neurosci.* (2004) 5(6):483-94.
- Wojda A, Witt M. **Manifestations of aging at the cytogenetic level.** *J. Appl. Genet.* (2003) 44(3):383-399.
- Yang L, Calingasan NY, Thomas B, Chaturvedi RK, Kiaei M, Wille EJ, Liby KT, Williams C, Royce D, Risingsong R, Musiek ES, Morrow JD, Sporn M, Beal MF. **Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription.** *PLoS One.* (2009) 4(6):e5757. doi: 10.1371/journal.pone.0005757.
- Zhao F, Wu T, Lau A, Jiang T, Huang Z, Wang XJ, Chen W, Wong PK, Zhang DD. **Nrf2 promotes neuronal cell differentiation.** *Free Radic Biol Med.* (2009) 47(6):867-79. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.029.



PARTICIPACION DE LA VIA  
LBHQ/NrF2 EN LA PROTECCION  
DEL DAÑO OXIDANTE POR 3NP EN  
RATAS VIEJAS

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

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO  
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ  
DRA. SONIA GALVAN ARZATE  
DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL



ALEJANDRO SILVA PALACIOS  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de  
Secretaría la última, se reunieron para proceder al Examen  
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la  
obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ALEJANDRO SILVA PALACIOS

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

*Apruebo*

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

VOCAL

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

VOCAL

DRA. SONIA GALVAN ARZATE

SECRETARIA

DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL