

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa



**Casa abierta al tiempo**

**“Inducción del factor de transcripción Nrf2 en dos contextos patológicos:  
Enfermedad de Huntington asociada a la edad e isquemia-reperfusión  
cardíaca”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

**M. en Biol. Exp. Alejandro Silva Palacios**

**COMITÉ TUTORAL**

Co-Directoras

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal**  
Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez

Asesor Externo

**Dr. Armando Luna López**  
Instituto Nacional de Geriátria

Junio/2019

## **Comité Tutorial**

### **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  
e-mail: [mkf@xanum.uam.mx](mailto:mkf@xanum.uam.mx)

### **Co-Directora**

#### **Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal**

Investigador en Ciencias Médicas “F”  
Subdirectora de Investigación  
Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez  
e-mail: [azazuetam@yahoo.com](mailto:azazuetam@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 Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT a Alejandro Silva Palacios para estudios doctorales: 283838

Se contó también con una beca mixta de movilidad académica para realizar una estancia de 6 meses, del 15 de junio al 15 de diciembre del 2018 en el Laboratorio de Genética Funcional del Sistema de Fosforilación Oxidativa, del Departamento de Fisiopatología del Miocardio, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares-Carlos III (CNIC, F.S.P) en Madrid, España. Además, la estancia de investigación fue apoyada por la Dra. Mina Königsberg Fainstein, como parte de un proyecto aprobado por CONACYT.

La investigación presentada en esta tesis se desarrolló tanto en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, así como en el Departamento de Biomedicina Cardiovascular, en el Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez. Contó con financiamiento de CONACYT con el número de proyecto 177527 y 283363 de la Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal y con los números de proyectos FON.INST/298/2016 y FOSSIS-2016 272256 de la Dra. Mina Königsberg Fainstein.

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:

**“Inducción del factor de transcripción Nrf2 en dos contextos patológicos: Enfermedad de Huntington asociada a la edad e isquemia-reperfusión cardíaca”, que presentó**

Alejandro Silva Palacios

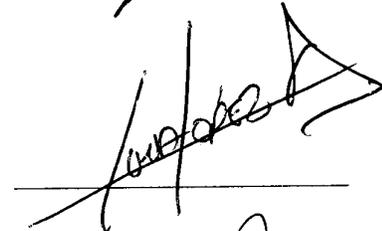
El día 12 de Junio del año 2019.

Sinodales

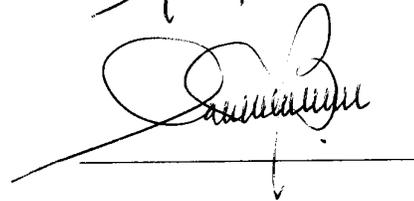
Dra. Verónica Souza Arroyo  
PRESIDENTA  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



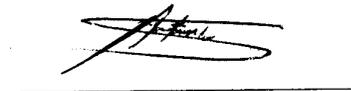
Dr. Armando Luna López  
SECRETARIO  
Laboratorio de Envejecimiento y Estrés Oxidante  
Instituto Nacional de Geriatria



Dra. Mabel Buelna Chontal  
VOCAL  
Departamento de Biomedicina Cardiovascular  
Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez



Dr. Abel Santamaría del Ángel  
VOCAL  
Laboratorio de Aminoácidos Excitadores  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía-Manuel Velasco Suárez



## Índice

	<b>Página</b>
i. Resumen	11
ii. Abstract	12
iii. Lista de abreviaturas	13
iv. Lista de figuras	16
v. Lista de tablas	17
I. INTRODUCCIÓN	
1. Estrés oxidante y mecanismos de protección .....	18
1.1 Homeostasis redox	
1.1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno	
1.1.2 Estrés oxidante y sus consecuencias	
1.1.3 Eliminación de especies reactivas de oxígeno	
1.1.4 Papel de las especies reactivas de oxígeno como moléculas señalizadoras	
2. Mecanismo de regulación redox en procesos celulares .....	23
2.1 NF-E2-related factor (Nrf2)	
2.2 Inducción de Nrf2	
3. Activación de Nrf2 en contextos patológicos .....	25
3.1 Envejecimiento y Enfermedad de Huntington	
3.1.1 Enfermedad de Huntington: ¿Desorden neurocardíaco?	
3.1.2 Modelo farmacológico de la Enfermedad de Huntington: Ácido 3-nitropropiónico	
3.1.2.1 Breve historia del ácido 3-nitropropiónico	
3.1.2.2 Mecanismo de acción del ácido 3-nitropropiónico	
3.1.3 Sobrevivencia celular: Papel del Nrf2	
3.2 Isquemia-reperfusión cardiaca	
3.2.1 Evento celulares en la isquemia-reperfusión	
3.2.1.1 Isquemia	
3.2.1.1 Reperfusión	
3.2.1.3 Lesión por reperfusión	
3.2.2 Consecuencias del daño por reperfusión	
3.2.3 Estrategias terapéuticas para aumentar la tolerancia a la isquemia	
3.2.3.1 Acondicionamiento isquémico	
3.2.3.2 Papel de las RISK y el factor de transcripción Nrf2	
3.2.3.3 Sulforafano	
II. JUSTIFICACIÓN DE AMBOS MODELOS .....	41

III. HIPÓTESIS DE AMBOS MODELOS .....	42
IV. MODELOS ESTUDIADOS	
2. “Daño cardíaco en un modelo de la Enfermedad tipo Huntington en ratas envejecidas: Papel de las especies reactivas de oxígeno” .....	43
V. OBJETIVOS .....	44
1.1 General	
1.1.1 Particulares	
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
1.2.1 Animales	
1.2.2 Reactivos	
1.2.3 Anticuerpos	
1.2.4 Grupos experimentales	
1.2.5 Evaluación de la función cardíaca por ecocardiografía	
1.2.6 Análisis histológico	
1.2.7 Marcadores de daño por estrés oxidante	
1.2.8 Aislamiento de fracciones citosólicas y nucleares	
1.2.9 Análisis de Western blot	
1.2.10 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)	
1.2.11 Análisis estadístico	
VII. RESULTADOS .....	49
1.3.1 Función cardíaca y análisis estructural	
1.3.2 Histología cardíaca	
1.3.3 Remodelación cardíaca	
1.3.4 Marcadores de daño por estrés oxidante	
1.3.5 Translocación nuclear de Nrf2	
1.3.6 Eficiencia de la unión Nrf2-ARE en los corazones de animales adultos y viejos	
VIII. DISCUSIÓN .....	56
IX. MODELOS ESTUDIADOS	
2. “Daño por isquemia-reperfusión: Efecto del sulforafano en la activación del Nrf2” .....	59
X. OBJETIVOS .....	60
2.1 General	
2.1.1 Particulares	
XI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	61
2.2.1 Animales	
2.2.2 Reactivos y anticuerpos	
2.2.3 Experimentos <i>in vivo</i>	

2.2.4 Grupos experimentales	
2.2.5 Medición del tamaño del infarto y examinación cardíaca	
2.2.6 Medición de lactato deshidrogenasa en suero	
2.2.7 Obtención de fracciones nucleares y citosólicas	
2.2.8 Marcadores de daño por estrés oxidante	
2.2.9 Ensayo de la actividad de NAD(P)H-quinonaoxidoreductasa-1	
2.2.10 Determinación de citocinas pro-inflamatorias	
2.2.11 Análisis por inmunoblot	
2.2.12 Inmunotinción cardíaca	
2.2.13 Análisis estadístico	
XII. RESULTADOS .....	66
2.3.1 Función y estructura cardíaca	
2.3.2 Marcadores de daño por estrés oxidante y nitrosante	
2.3.3 Respuesta inflamatoria	
2.3.4 Activación de proteínas cinasas involucradas en la cardioprotección	
2.3.5 La activación de Nrf2 se asocia a la atenuación del estrés oxidante y a la cardioprotección en corazones post-acondicionados, pero no en corazones tratados con sulforafano	
XIII. DISCUSIÓN .....	75
XIV. CONCLUSIONES GENERALES .....	78
XV. PERSPECTIVAS .....	79
XVI. REFERENCIAS .....	80
XVII. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS .....	99

## **Agradecimientos**

Temo no encontrar las palabras justas o cometer alguna(s) omisión(es), para expresar mi entera gratitud. Sentarme a escribir estas líneas me ha tomado mucho tiempo, pues muchas han sido las personas que me han acompañado en esta travesía. No podría agradecerles individualmente (me tomaría muchas líneas), lo que si puedo hacer es englobar en una sola frase el más sincero de mis agradecimientos:

### **¡Muchas gracias a todos!**

A la Dra. Mina y a la Dra Ceci (a la Dra Ceci y a la Dra Mina, aquí encaja bien el dicho: el orden de los factores no altera el producto) gracias por todo y, literalmente es así... ¡POR TODO! Por su apoyo, su tiempo, su amistad, sus enseñanzas, su profesionalismo, su paciencia... Por ser mis consejeras durante todo este tiempo de mi preparación académica y profesional. Aunque muchas veces me han repetido que ha sido mi trabajo, estoy seguro que no podría lograrlo sin ustedes. Bien dicen que de las grandes maestras es de quien se aprende...

Gracias a mis compañer@s de laboratorio, estas dos grandes familias que forme durante todo este tiempo. Nombrar a cada uno de ustedes, y escribir en tan sólo una línea el apoyo que me han dado, para mí sería imposible. Gracias, al equipo de Biomedicina Cardiovascular por su ayuda incondicional y al laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular de quien me llevo grandes amistades. De verdad gracias...!

Aunque fue poco el tiempo con ustedes, aprendí y forje grandes amistades que me llevo en el alma. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de la familia OXPPOS, por ser tan amables desde mi llegada y siempre cobijarme y tener palabras de aliento cuando más lo necesite. A todos, de verdad, gracias. En especial, a Toño por hacerme ver que siempre se puede ir más allá en la investigación, por esos seminarios amenos y constructivos. A Sara por tener esa personalidad que se contagia, por darme esa tranquilidad que necesite cuando nada era positivo, por tus consejos, pláticas y tu pensamiento científico. Gracias por darme un poco de tu tiempo y guiarme en todo momento ¡Doctora, conocerte en verdad fue una gran fortuna! A Rachel, por ser tan buena y por darme esa figura materna que necesite a la distancia, gracias por tu cobijo, humildad y naturalidad para que todo vaya mejor.

Gracias a ese gran equipo de personas que me han forjado como profesional: al Dr. Armando Luna, la Dra. Mabel Buelna, el Dr. Francisco Correa, el Dr. Mohammed El Hafidi, la Dra. Angélica Ruiz, el Dr. Abel Santamaría y muchos más (me sería imposible nombrar por cuestiones de espacio) de quienes me he robado un poco de su conocimiento.

Pero, nada de esto habría sido posible sin personas fundamentales en mi vida. Gracias mami por estar aquí, por escucharme y no perder la paciencia conmigo (aunque había veces en que sí). Este es el trabajo del que tanto te hablo y que solo me respondes que es interesante. Valió la pena y éste es el fruto de tanto esfuerzo y ganas de salir adelante de ambos, te amo mami! A mis hermanos de quien siempre recibí palabras de aliento y, sobretodo, por hacerme más ameno este camino con sus risas. A mi familia entera, por sus reuniones, días de nostalgia, fuerza y risas.

A ti, mi gran amor, por tu tiempo, tu espacio, por esos abrazos cuando la nostalgia llegaba a mí, por darme palabras de aliento cada vez que me derrumbaba, por demostrarme, con tu ejemplo, que el querer es po-

der. Gracias por ayudarme a fortalecer mis debilidades, por tu paciencia, por comprender que algunas veces necesitaba decir no, para dedicar más tiempo a esto, mi pasión por el laboratorio. Gracias por esperarme todo el tiempo necesario para cumplir mis metas y expectativas de vida y profesionales, pero sobre todo por hacerme feliz.

Todo este trabajo, esta dedicado a ti y a mi mamá, mis más grandes amores.

Solo me resta decir que todo ha valido la pena... Estoy seguro que esta aventura apenas inicia y que lo mejor esta por llegar... ¡Muchas gracias!

*Difficile est tenere quae acceperis nisi exerceas*  
(Es difícil retener lo que has aprendido a menos que debas practicarlo)

Gaius Caecilius Cilo

*Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas*  
-Marie Curie-

## **i. Resumen**

Con el aumento en la expectativa de vida, en nuestro país, así como en el resto del mundo, las enfermedades cardiovasculares y las neurodegenerativas han aumentado en gran medida. Sin embargo, a pesar de los tratamientos existentes, la progresión de estas enfermedades persiste, limitando la calidad y la esperanza de vida de los pacientes. En la presente tesis, abordamos dos aproximaciones experimentales distintas, para determinar si la activación del Nrf2 podría ser un participante común en el (los) mecanismo(s) de protección en el corazón.

En una primera instancia, evaluamos el efecto del ácido 3-nitropropiónico (3-NP) sobre la función cardíaca en ratas y si dicha condición podría agravarse durante el envejecimiento. Administramos tert-butilhidroquinona (tBHQ) para inducir la activación del factor de transcripción Nrf2, como posible blanco de protección para disminuir el daño oxidante inducido por 3-NP. Encontramos cambios en la estructura cardíaca asociados con la edad y desarreglo de las fibras cardíacas inducida por el tratamiento con 3-NP en animales adultos y viejos; sin embargo, estas condiciones no estuvieron acompañadas por disfunción cardíaca. En contraste con los animales adultos, en los que la oxidación de proteínas y lípidos aumentaron significativamente, los corazones de animales viejos desarrollaron una respuesta hormética relacionada con la exposición crónica a estrés oxidante que no aumentó tras la intoxicación con 3-NP. A nivel celular el tBHQ disminuyó el estrés oxidante en asociación con la translocación nuclear de Nrf2 y su unión a ARE en animales jóvenes.

Por otro lado, en el segundo modelo, estudiamos el mecanismo por el cual el sulforafano (SFN) ejerce efectos cardioprotectores en corazones sometidos a isquemia-reperfusión (I/R) y comparamos su eficiencia con la maniobra mecánica del post-acondicionamiento (PostC), el cual activa mecanismos de señalización celular endógena que conducen a la protección del corazón. La administración del SFN y la aplicación del PostC preservaron la función y la arquitectura del tejido cardíaco en asociación con una disminución del tamaño del infarto y la liberación de lactato deshidrogenasa en suero. El estrés oxidante se redujo y el balance del estado redox se mantuvo con ambas estrategias. También observamos que ambas estrategias activan las rutas de señalización río arriba de Nrf2; pero sólo el PostC logra incrementar la acumulación nuclear de fosfo-Nrf2. Se sugiere que el efecto protector del SFN podría ser independiente del Nrf2, o bien que la fosforilación del factor ocurre antes de los 60 min de perfusión.

Concluimos que en patologías asociadas al estrés oxidante, se pueden activar mecanismos de protección por diferentes vías, que convergen en la activación del factor de transcripción Nrf2 y de cascadas de señalización, que al actuar de forma independiente o sinérgica, garantizan la sobrevivencia celular y del tejido.

## ii. Abstract

With the increase in life expectancy in our country, as well as in the rest of the world, cardiovascular and neurodegenerative diseases have increased to a great extent. However, treatments indicated have advanced notably, the progression of these diseases persists, limiting the patients quality and life expectancy. In this study, we approached two different experimental strategies, in order to determine if the activation of Nrf2 could be a common participant in the mechanism(s) of protection in the heart.

In the first instance, we evaluated the effect of 3-nitropropionic acid (3-NP) on cardiac function in rats and whether this condition could be exasperated during aging. We administered tert-butylhydroquinone (tBHQ) to induce the activation of the transcription factor Nrf2, as a possible protection target to reduce the oxidative damage induced by 3-NP. We found changes in cardiac structure associated with the age and derangement of cardiac fibers induced by 3-NP treatment in adult and old animals, however, these conditions were not accompanied by cardiac dysfunction. In contrast to adult animals, in which the oxidation of protein and lipids increased significantly, the heart of old animals developed a hormetic response related to chronic exposure to oxidative stress that did not increase after 3-NP intoxication. At the cellular level, tBHQ decreased oxidative stress in association with de nuclear translocation of Nrf2 and it's binding to ARE in young animals.

On the other hand, in the second model, we studied the mechanism by which sulforaphane (SFN) exerts cardioprotective effects in hearts undergoing ischemia-reperfusion (I/R) and we compare its efficiency with the mechanical maneuver of post-conditioning (PostC), which activates mechanisms of endogenous cellular signaling leading to the protection of the heart. The administration of SFN and the application of PostC preserved the function and architecture of cardiac tissue in association with a decrease in infarct size and the release of lactate dehydrogenase in serum. The oxidative stress was reduced and the balance redox state was maintained with both strategies. We also observed that both strategies activate the signaling routes upstream of Nrf2, but only PostC manages to increase the nuclear accumulation of phospho-Nrf2. It is suggested that the protective effect of SFN could be independent of Nrf2, or that phosphorylation of the factor occurs before 60 min of reperfusion.

We conclude that in the pathologies associated with oxidative stress, is possible to activate protective mechanisms through different strategies, that converge in signaling and Nrf2 activation, which guarantee cell and tissue survival.

### iii. Lista de abreviaturas

3-NP:	Ácido 3-nitropropiónico
Akt:	Proteína cinasa B
AMPA:	Amino $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico ( <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate</i> )
AMPK:	Cinasa activada por adenosina monofosfato ( <i>protein kinase AMP-activated</i> )
ANOVA:	Análisis de varianza de una vía
Atg:	Proteínas relacionadas a autofagia ( <i>autophagy-related protein</i> )
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADP:	Adenosín difosfato
ARE:	Elemento de respuesta antioxidante ( <i>antioxidant response element</i> )
ATP:	Adenosín trifosfato
Buffer RIPA:	Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación ( <i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i> )
Buffer TBE:	Buffer Tris-Borato-EDTA
BHA:	2(3)-tert-butil-4-hidroxianizol
CAG:	Citosina-Adenina-Guanina
CAT:	Catalasa
CI:	Complejo I, NADH deshidrogenasa o NADH:Ubiquinona oxidoreductasa
CII:	Complejo II o succinato deshidrogenasa
CIII:	Complejo III o complejo citocromo bc1
CIV:	Complejo IV o citocromo c oxidasa
CTE:	Cadena de transporte de electrones
Cu/Zn-SOD:	Superóxido dismutasa dependiente de Cobre/Zinc o SOD tipo 1 citoplasmática
CV:	Complejo V o ATPasa F <sub>0</sub> F <sub>1</sub>
Drp1:	Proteína relacionada a dinamina-1 ( <i>dynamin related protein 1</i> )
EMSA:	Ensayo de movilidad electroforética ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> )
EH:	Enfermedad de Huntington
EO:	Estrés oxidante
EpRE:	Elemento de respuesta a electrófilos ( <i>electrophilic response element</i> )
ERK:	Cinasa regulada por señales extracelulares ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
Fe-SOD:	Superóxido dismutasa dependiente de Hierro o SOD tipo 2 mitocondrial
Gm:	Glucorafanina
GSK-3:	Cinasa glucógeno sintasa 3 ( <i>glycogen synthase kinase-3</i> )
GPx:	Glutación peroxidasa
GSH:	Glutación reducido

GSSG:	Disulfuro de glutation o glutation oxidado
GST:	Glutación S-transferasa
H&E:	Hematoxilina-eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrogeno
HO-1:	Hemo-oxigenasa-1
Htt:	Huntingtina
I/R:	Isquemia-Reperfusión
IAM:	Infarto agudo al miocardio
IL-18:	Interleucina-18
IL-1 $\beta$ :	Interleucina-1 beta
IL-6:	Interleucina-6
IPC:	Pre-acondicionamiento isquémico
JAK:	Cinasa activada por Janus
JNK:	Cinasa N-terminal c-Jun ( <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
Keap1:	<i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>
LAMP2A:	Proteína de membrana asociada a lisosomas-2A ( <i>lysosomal associated membrane protein 2A</i> )
LC3:	Cadena ligera de la proteína asociada a microtúbulos ( <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> )
LV:	Ventrículo izquierdo ( <i>left ventricle</i> )
LVEDD:	Dimensión del LV al final de la diástole ( <i>LV dimension at end diastole</i> )
LVEDP:	Presión desarrollada del LV al final de la diástole ( <i>LV end-diastolic pressure</i> )
LVESD:	Dimensión del LV al final de la sístole ( <i>LV dimension at end systole</i> )
LVESP:	Presión desarrollada del LV al final de la sístole ( <i>LV end-systolic pressure</i> )
MCU:	Uniportador de calcio mitocondrial
MEM:	Matriz extracelular del miocardio ( <i>myocardium extracellular matrix</i> )
MMP-2:	Metaloproteinasa-2
mPTP:	Poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial
mTOR:	Blanco en mamíferos/mecanicista de rapamicina ( <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i> )
Maf:	Proteínas de fibrosarcoma músculoaponeurotico ( <i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i> )
MAPK:	Cinasas activadas por mitogen ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MDA:	Malondialdehído
mHtt:	Huntingtina mutada
Mn-SOD:	Superóxido dismutasa dependiente de Manganeso citoplasmática/mitocondrial
mtADN:	ADN mitocondrial
NF- $\kappa$ B:	Factor nuclear- $\kappa$ -B ( <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>-B</i> )

NO:	Óxido nítrico
NOS:	Sintasa de óxido nítrico
NQO1:	NADP(H)quinonaoxidoreductasa-1
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamida de adenin dinucleótido en su forma oxidada
NADH:	Nicotinamida de adenin dinucleótido
NMDA:	N-metil-D-aspartato ( <i>N-methyl-D-aspartate</i> )
Nrf2:	Factor nuclear relacionado a NF-E2 ( <i>NFE2L2 (NRF2) nuclear factor erythroid 2 like 2</i> )
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Anión superóxido
ONOO•:	Peroxinitrito
OxPhos:	Fosforilación oxidativa ( <i>oxidative phosphorylation</i> )
PGC-1 $\alpha$ :	Proteína 1 $\alpha$ co-activadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 alpha</i> )
PostC:	Post-acondicionamiento
PreC:	Pre-acondicionamiento
PERK:	Cinasa de retículo endoplásmico tipo proteína cinasa RNA ( <i>protein kinase-like endoplasmic reticulum (ER) kinase</i> )
PI-3K:	Fosfatidilinositol 3-cinasa ( <i>fosfatidilinositol 3-kinase</i> )
PKC:	Proteína cinasa C
poliQ:	poli-glutamina
RISK:	Cinasas de salvamento del daño por reperfusión ( <i>reperfusion injury salvage kinase</i> )
SAFE:	Ruta para incrementar al factor activador de sobrevivencia ( <i>survivor activator factor enhancement pathway</i> )
SFN:	Sulforafano
SQSTM1:	Secuestrosoma-1
SSI:	Solución salina isotónica
STAT3:	Factor de transcripción activador y transductor-3 ( <i>transducer and activator of transcription 3</i> )
SDH:	Succinato deshidrogenasa
TBA:	Ácido tiobarbitúrico
TBARS:	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
tBQ:	tert-butilbenzoquinona
TNF $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral-alfa ( <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
tBHQ:	tert-butilhidroquinona
ULK1:	Proteína serine/treonin cinasa 1 tipo unc-51 ( <i>unc-51-like kinase 1</i> )
VGCCs:	Canales de calcio dependientes de voltaje ( <i>voltage-gated calcio channel</i> )
•OH:	Radical hidroxilo
$\gamma$ -GCS:	$\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa

#### **iv. Lista de figuras**

- Figura 1 Generación de especies reactivas de oxígeno y sistemas de protección.
- Figura 2 Inducción del factor de transcripción Nrf2.
- Figura 3 Enfermedad de Huntington como un desorden multisistémico.
- Figura 4 Mecanismo de acción del ácido 3-nitropropiónico.
- Figura 5 Eventos celulares en la toxicidad inducida por el ácido 3-nitropropiónico.
- Figura 6 Inducción del Nrf2 por tert-butilhidroquinona.
- Figura 7 Eventos celulares durante la isquemia-reperfusión.
- Figura 8 Acondicionamiento isquémico y cascadas de señalización.
- Figura 9 Sulforafano y su papel con el factor de transcripción Nrf2.
- Figura 10 Esquema de tratamientos administrados a animales adultos y viejos.
- Figura 11 Efecto del tratamiento con el ácido 3-nitropropiónico en la función cardíaca de animales adultos y viejos.
- Figura 12 Secciones del ventrículo izquierdo teñidas con H&E y tricrómico de Masson.
- Figura 13 Remodelación cardíaca en corazones de animales adultos y viejos.
- Figura 14 Marcadores de daño por estrés oxidante.
- Figura 15 Contenido de Nrf2 en homogenado total, citosol y núcleo de corazones de animales adultos y viejos.
- Figura 16 Activación de Nrf2 y la respuesta antioxidante en animales adultos y viejos.
- Figura 17 Grupos experimentales en isquemia-reperfusión.
- Figura 18 Sulforafano disminuye el daño inducido por la isquemia-reperfusión.
- Figura 19 Marcadores de daño por estrés oxidante y nitrosante.
- Figura 20 Papel de la inflamación en ratas sometidas a isquemia-reperfusión.
- Figura 21 Señalización celular inducida por el post-acondicionamiento y sulforafano.
- Figura 22 Evaluación de enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 y su activación en corazones post-acondicionados y tratados con sulforafano.
- Figura 23 Papel del sulforafano en otros mecanismos de protección.

## **v. Lista de tablas**

- Tabla 1. Clasificación de antioxidantes
- Tabla 2. Parámetros estructurales y funcionales de animales adultos y viejos
- Tabla 3. Efecto del post-acondicionamiento y el sulforafano en la función cardiaca de ratas sometidas a isquemia-reperfusión

# I. Introducción

## 1. ESTRÉS OXIDANTE Y MECANISMOS DE PROTECCIÓN

Las *especies reactivas de oxígeno (ERO)*, sobre las que hablaré a detalle más adelante, han estado presentes en los diferentes sistemas biológicos durante el proceso de evolución de la vida aeróbica. En cada célula del cuerpo los procesos metabólicos generan ERO y los sistemas antioxidantes los controlan de manera efectiva manteniendo un balance homeostático. El resultado de la acumulación de ERO en las células a niveles que exceden la capacidad de los sistemas de eliminación de daño y reparación de ERO de la célula, se conoce como *estrés oxidante (EO)* [Mittler, 2017]. Hasta ahora, la regulación de las ERO es un tema de relevancia al ser una estrategia terapéutica prometedora, ya que el EO sostenido se considera el punto de partida para la aparición de diversas enfermedades crónicas, muchas veces asociadas a la edad. Por lo tanto, explorar el equilibrio y los mecanismos positivos y negativos que controlan la producción de las ERO en los sistemas vivos, brindaría claves para “descubrir” nuevas terapias en la clínica.

### 1.1 Homeostasis redox

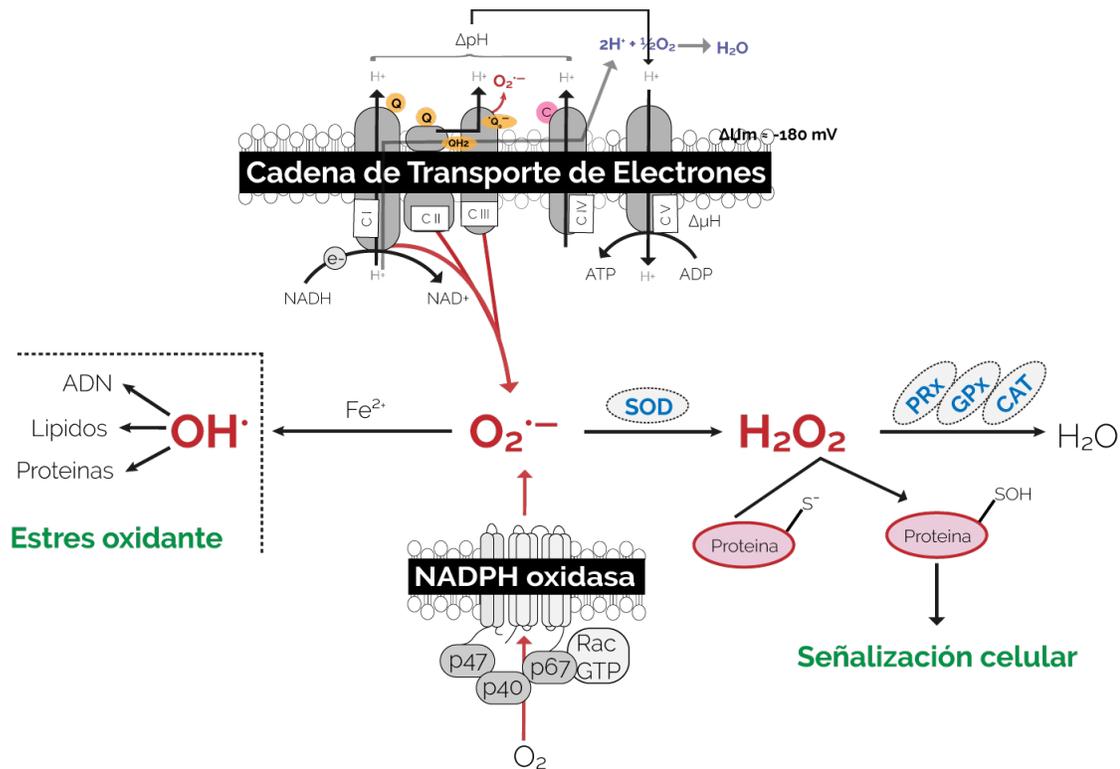
#### 1.1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno

Las ERO son producto del metabolismo aeróbico [Zuo et al., 2015] y/o de fuentes como fármacos, xenobióticos y radiación [D'Autréaux & Toledano, 2007; Davies et al., 2017]. Entre las ERO más estudiadas se encuentran el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), cuya reactividad depende de sus propiedades químicas, de los sitios donde se produzcan y de su biodisponibilidad [Aguilera et al., 2018]:

- A. El  $O_2^{\bullet-}$ , resulta de la reducción monovalente del oxígeno molecular por varias oxidasas, tal como xantina oxidasa, ciclo-oxigenasa, NADPH oxidasa [Pisoschi & Pop, 2015]. Además de formarse en la cadena de transporte de electrones (CTE), en el curso de la fosforilación oxidativa (OxPhos) para producir adenosín trifosfato (ATP) [Dröse & Brandt, 2012]. Su producción en grandes cantidades puede dañar e inactivar proteínas que contienen centros hierro-azufre (Fe-S), como la ferritina y proteínas tipo hemo [Schieber & Chandel, 2014].
- B. El  $H_2O_2$ , es generado tras la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  por la enzima superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial y citosólica, y por la NADPH oxidasa; presenta una alta estabilidad y tiene la capacidad de cruzar las membranas biológicas [Brown & Griendling, 2015].
- C. El  $\bullet OH$ , es extremadamente reactivo y se forma por la descomposición del  $H_2O_2$  a través de reacciones tipo Fenton [Cadet & Wagner, 2013]. Oxida a lípidos, proteínas y ácido desoxirribonuclei-

co (ADN) indiscriminadamente, provocando daño e inestabilidad genómica [Brown & Griendling, 2015].

La CTE y la NADPH oxidasa son las principales fuentes fisiológicas de la producción del  $O_2^{\bullet-}$ , que pueden convertirse en otras ERO como se muestra en la *Figura 1* [Moris et al., 2017].



**Figura 1** Generación de las especies reactivas de oxígeno y sistemas de protección. CI: complejo I, CII: complejo II, CIII: Complejo III, CIV: Complejo IV, CV: Complejo V,  $e^-$ : electrones, PRx: Peroxiredoxina, GPx: Glutatión peroxidasa, CAT: Catalasa, SOD: Superóxido dismutasa, ATP: adenosín trifosfato, ADP: adenosín difosfato, Q: quinona, QH<sub>2</sub>: ubisemiquinona,  $Q_2^{\bullet-}$ : semiubiquinona inestable,  $\Delta\psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial,  $\Delta pH$ : gradiente de protones,  $\Delta\mu H$ : fuerza protón motriz.

### 1.1.2 Estrés oxidante y sus consecuencias

El delicado balance entre la generación y eliminación de las ERO se mantiene por mecanismos complejos, cuya disfunción contribuye a generar alteraciones en el estado redox y daño a diferentes biomoléculas como las siguientes (*Figura 1*):

- A. *Lípidos*, son los más susceptibles a modificaciones oxidantes [Trachootham et al., 2008]. La lipoperoxidación genera radicales lipídicos, los cuales reaccionan con otras moléculas lipídicas, propagándose una reacción en cadena. Los ácidos grasos pueden formar al lipoperóxido (un no radical) o producir aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonal [Pinchuk et al.,

1998]. El primero puede reaccionar con las bases del ADN generando mutaciones; mientras el segundo reacciona mayormente con las proteínas, afectando diversas rutas de señalización. Se sabe, por ejemplo, que este aldehído se relaciona con la activación de proteínas como la cinasa JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y la caspasa-3, induciendo mecanismos de muerte celular [Awasthi et al., 2003]. Además, la modificación a la membrana causa cambios en su fluidez, resultando en la pérdida de la afinidad ligando-receptor, alteración de la función de hormonas/neurotransmisores y aumento de la permeabilidad, lo que conduce a muerte celular [Königsberg, 2013].

- B. *Proteínas*, ciertos residuos aminoacídicos son particularmente susceptibles a la oxidación. Por ejemplo: la histidina, la prolina, la cisteína, el triptófano y la tirosina son muy sensibles a la oxidación catalizada por metales; en menor grado lo son la arginina, la lisina y la metionina [Trachootham et al., 2008]. Dicha oxidación resulta en derivados carbonilos cuya detección se ha usado como marcador cuantitativo de la oxidación de proteínas y de EO [Santos et al., 2018]. El entrecruzamiento intra- e intermolecular de grupos tioles tras la oxidación de cisteínas, resulta en la formación de puentes disulfuro que cambian la conformación de las proteínas, promueven su agregación y, en muchos casos, disminuyen o aumentan su actividad. El estrés crónico y la oxidación continua de las proteínas pueden llevar al desdoblamiento o al plegamiento defectuoso de las mismas proteínas, así como a la formación de oligómeros o agregados insolubles que se acumulan en el citosol [Zuo et al., 2015]. La acumulación de estos oligómeros, es un sello distintivo de enfermedades como Parkinson, Alzheimer y Huntington, que se han denominado trastornos de proteínas plegables o *proteinopatías* [Shaid et al., 2013].
- C. *ADN*, sujeto a daño en casi todos sus componentes; se estima que en las células de mamíferos se forman  $\sim 1.5 \times 10^5$  aductos en el ADN [Beckman & Ames, 1997]. Los daños directos ocurren sobre las bases púricas (C-5,6) y pirimídicas (C-4,8), sobre los azúcares (desoxirribosa) o en ambos sitios. Cuando el  $\cdot\text{OH}$  ataca las bases nitrogenadas no hay abstracción del H, ya que el  $\cdot\text{OH}$  se une directamente a la base nitrogenada formando un aducto. La adición del  $\cdot\text{OH}$  al C-8 produce un aducto radical llamado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina el cual es una de las especies químicas más abundantes y resistentes que se producen cuando se oxida el ADN [Cadet & Wagner, 2013]. El daño oxidante sobre el ADN genera mutaciones puntuales y deleciones, está involucrado en el proceso de envejecimiento y en una gran diversidad de enfermedades asociadas a la edad [van Raamsdonk, 2015; Santos et al., 2018].
- D. *ADN mitocondrial (mtADN)*, es muy susceptible al daño oxidante debido a su proximidad al principal sitio de generación de ERO (CTE). Además, no posee proteínas tipo histona que lo cubran y protejan, así como a su limitada capacidad de reparación [Königsberg, 2013]. La acumulación de mutaciones en el mtADN contribuye de manera fundamental en el fenómeno del envejecimiento, así como en enfermedades degenerativas y miopatías mitocondriales [Santos et al., 2018].

### 1.1.3 Eliminación de especies reactivas de oxígeno

La transformación enzimática de las ERO a moléculas menos reactivas es parte de los mecanismos mediante los cuales las células se protegen del daño oxidante. Para ello utiliza la producción de antioxidantes endógenos, así como a la absorción de antioxidantes o de sus precursores provenientes de la dieta (*Figura 1*). En un ambiente biológico, los oxidantes y reductores son también llamados *pro-oxidantes* y *antioxidantes*, respectivamente [Simioni et al., 2018]. La maquinaria enzimática antioxidante está conformada por enzimas y otras moléculas, entre las que destacan:

- A. *Superóxido dismutasa (SOD)*, que se clasifica como Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD con base a los cofactores metálicos presentes en el sitio activo [Younus, 2018] y SOD Níquel [Miller, 2001]. Se distribuyen en diferentes compartimentos celulares catalizando la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  en oxígeno molecular y  $H_2O_2$ , por lo tanto, disminuyen los niveles del  $O_2^{\bullet-}$  [Yasui & Baba, 2006].
- B. *Catalasa (CAT)* y *peroxidasas*, constituyen el segundo nivel de defensa contra las ERO, tienen un papel importante en la respuesta adaptativa al  $H_2O_2$  ya que lo transforman en agua [Izawa et al., 1996; Sepasi Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018].
- C. *Glutación (GSH)*, es el tiol no enzimático más abundante en la célula. Entre sus funciones, la defensa antioxidante es una de las más importantes, contrarrestando constantemente el incremento de las ERO, minimizando el daño oxidante a tejidos y células. En respuesta a EO, dos moléculas de GSH se oxidan a glutación oxidado o disulfuro de glutación (GSSG), que se reduce de nuevo a glutación reducido (GSH) a través de GSSG reductasa a expensas de la oxidación de NADPH que proviene del ciclo de las pentosas [Forman et al., 2009; Giustarini et al., 2017]. Además, el GSH se usa como cofactor de la enzima glutación peroxidasa (GPx) reduciendo al  $H_2O_2$  con la producción de GSSG y agua [Lushchak, 2012]. La destoxicación de xenobioticos y/o de sus metabolitos es otra de sus funciones primordiales, a través de enzimas como la glutación *S*-transferasa (GST), que covalentemente conjugan al grupo tiol del GSH con el sustrato electrofílico respectivo [Lu, 2013; Dringen et al., 2015]. A este respecto, la destoxicación de xenobióticos se lleva a cabo por enzimas de fase I, fase II y fase III. Particularmente, las enzimas de destoxicación de fase II catalizan reacciones de conjugación que adicionan GSH a los xenobióticos activados [Cooper & Hanigan, 2010]. Sus tres principales reservorios son el citosol (80-85%), la mitocondria (10-15%) y en un pequeño porcentaje el retículo endoplásmico [Meredith & Reed, 1982; Hwang et al., 1992].

Existen otros *antioxidantes no enzimáticos* en la célula, que interactúan con las ERO y terminan las reacciones en cadena de los radicales libres [Liguori et al., 2018]; por ejemplo, la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), previene la lipoperoxidación de membranas celulares e inhibe a la proteína cinasa C (PKC) en el contexto del cáncer [Aggarwal et al., 2010]; en tanto, el  $\beta$ -caroteno, la albúmina (presente en la sangre) y el ácido úrico representan el 85% de la capacidad antioxidante en plasma [Wu et al., 2013]. Por último, los *anti-*

*oxidantes exógenos* incluyen a la vitamina C (que reduce al  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y a las moléculas fenólicas como el resveratrol, los flavonoides, el selenio y el zinc [Pisoschi & Pop, 2015]. En general, todos los antioxidantes no enzimáticos donan electrones que provienen de su grupo hidroxilo, neutralizando a la especie reactiva en cuestión, pero dejando un electrón sin aparear, lo que genera un radical libre y hace que, a su vez, estas moléculas puedan convertirse en *pro-oxidantes* [Saeidnia & Abdollahi, 2013]. En la siguiente tabla se resumen algunos ejemplos de los antioxidantes:

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes no enzimáticos (provenientes de la dieta)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SOD: <math>\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2</math></li> <li>• CAT: <math>2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}</math></li> <li>• GPx: <math>\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DHA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}</math></li> <li>• PRx: <math>\text{H}_2\text{O}_2 + \text{GSH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}</math></li> <li>• GR: <math>\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asc: Atrapa <math>\text{O}_2^{\cdot-}</math>, <math>\cdot\text{OH}</math> y <math>^1\text{O}_2</math> y reduce <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> a <math>\text{H}_2\text{O}</math> via la reacción APx</li> <li>• GSH: Sustrato para GST y GR, atrapador de <math>^1\text{O}_2</math>, <math>\cdot\text{OH}</math> y <math>\text{H}_2\text{O}_2</math>, actúa regenerando Asc via el ciclo Asc-GSH</li> <li>• Tocoferoles: Protegen a la membrana de la LPx, destoxificación de LPx y “quenching” de <math>^1\text{O}_2</math></li> <li>• Flavonoides: Atrapador de ERO</li> <li>• Carotenoides: “Quench” de <math>^1\text{O}_2</math></li> <li>• Polifenoles: Flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos</li> </ul>
<p><b>Antioxidantes no enzimáticos (en plasma)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ceruloplasmina</li> <li>• Ferritina</li> <li>• Transferrina</li> <li>• Albúmina</li> <li>• Metalotioneina</li> </ul>	

**Tabla 1. Clasificación de antioxidantes.** Asc: Ácido ascórbico; APx: Ascorbato peroxidasa; GR: Glutatión reductasa; LPx: Lipo-peroxidación; DHA: Dihidroascorbato.  $^1\text{O}_2$ : oxígeno singulete. Tomado de Mirończuk-Chodakowska et al. [2018].

### 1.1.4 Papel de las especies reactivas de oxígeno como moléculas señalizadoras

Desde hace algunas décadas, estudios en varios organismos, tejidos y tipos celulares han cambiado nuestro entendimiento de las ERO; es decir, ya no solo se ven como moléculas que provocan daño, sino que también tienen un papel en la regulación de vías de señalización que inciden en las respuestas biológicas y fisiológicas normales (es decir, la *biología redox-reacciones oxido-reducción*-la cual es dictada principalmente por los niveles y la compartimentalización del  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [Schieber & Chandel, 2014].

La señalización redox es necesaria para numerosos procesos celulares, como la diferenciación celular, la regeneración de tejidos y la prevención del envejecimiento [Holmström & Finkel, 2014; Reczek & Chandel, 2015]; aunque también es crucial para regular las vías de señalización que controlan diversos estados de enfermedad [Shadel & Horvath, 2015]. Por ejemplo, el ejercicio físico es una de las estrategias que incrementan las ERO, resultando en la activación de vías benéficas que disminuyen el cáncer, la diabetes y el envejecimiento [Ristow et al., 2009]. Por lo tanto, el balance entre la producción de las ERO y la eliminación de estas moléculas es crítico para que mantengan su papel señalizador y regulador en diferentes procesos celulares.

## 2. MECANISMOS DE REGULACIÓN REDOX EN PROCESOS CELULARES

### 2.1 NF-E2-related factor (Nrf2)

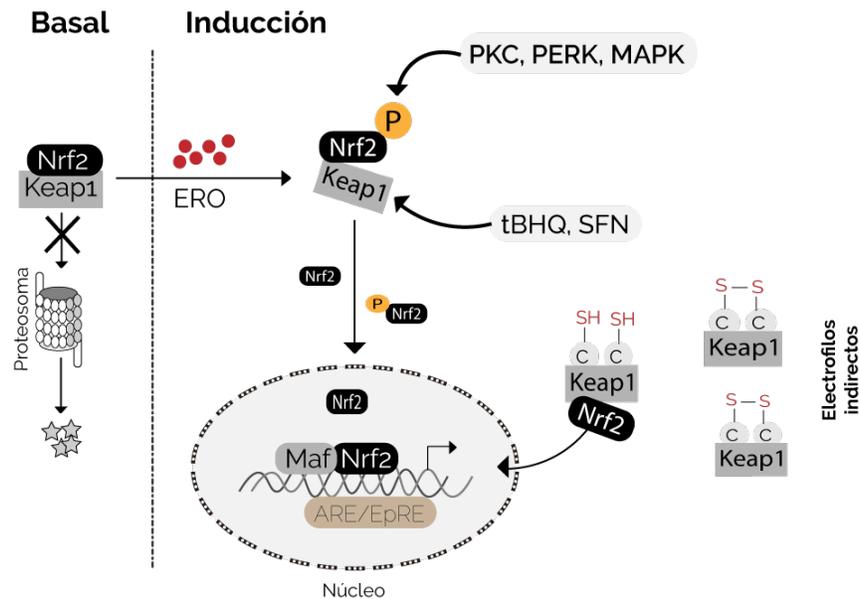
El factor de transcripción Nrf2 es un miembro de la familia de proteínas relacionadas a p45 (Nrf1, Nrf2 y Nrf3) que se heterodimerizan con proteínas Maf pequeñas (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) para unirse al elemento del ADN que actúa en *cis*, llamado ARE (*antioxidant response element*) o EpRE (*electrophile response element*), en las regiones regulatorias de muchos genes de protección o defensa antioxidante (*Figura 2*). Por muchos años este factor de transcripción se ha considerado un blanco terapéutico de gran valor en diferentes enfermedades asociadas con el estrés oxidante. La actividad de Nrf2 está regulada por su represor transcripcional (la proteína Keap1) aunque también existen otros mecanismos no canónicos que modulan su actividad, como la fosforilación por diferentes cinasas, etc. [Silva-Palacios et al., 2018; Silva-Islas & Maldonado, 2018]. En condiciones normales, el dímero de Keap1 se une a Nrf2, ubiquitinándolo e induciendo su proteólisis vía el proteosoma; mientras que, en condiciones de estrés, la disociación del complejo Nrf2/Keap1 evita su degradación (*Figura 2*). La mayor parte de los compuestos que inducen al factor de transcripción lo hacen interrumpiendo su unión con Keap1. Una vez activo, Nrf2 induce la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la homeostasis redox, el metabolismo de xenobióticos, el metabolismo anaeróbico, la reparación del daño al ADN, la proliferación y las respuestas de sobrevivencia, así como la autofagia y el proteosoma. Al aumentar la expresión de enzimas antioxidantes, mantiene la morfología y la función mitocondrial [Khan et al., 2018]. Gran parte de la investigación acerca de la modulación de Nrf2 se ha enfocado en la inducción de su activación; sin embargo, como se comentó previamente, la disminución en las ERO no siempre tiene efectos positivos para los organismos. Por lo tanto, una regulación inadecuada de su activación puede llevar a efectos deletéreos en muchas enfermedades, incluso aquellas asociadas a la edad [Menegon et al., 2016]. Por ejemplo, el ratón *knock out* de Nrf2 (*Nrf2<sup>-/-</sup>*) es más propenso a desarrollar cáncer en respuesta a estímulos químicos y físicos [Lida et al., 2004] e inducir un incremento en la metástasis [Sato et al., 2010]. Mientras que su hiperactivación confiere ventajas a las células cancerosas, que incluyen la protección ante la apoptosis y la senescencia, la promoción del crecimiento celular y la resistencia a quimio- y radioterapia [Zhang et al., 2010; Hayes et al., 2010]. Por lo tanto, el contexto celular es relevante para que la actividad del factor Nrf2 se traduzca en el mantenimiento del balance redox y de la funcionalidad de los procesos celulares.

### 2.2 Inducción de Nrf2

Los activadores/inductores de Nrf2 se pueden dividir en dos categorías, según su mecanismo de acción. La primera pertenece a los *activadores electrofílicos indirectos*, que se unen covalentemente al tiol de la cisteína en el dominio de dimerización de Keap1. La combinación con el activador provoca un cambio conformacional del represor, desencadenando la desintegración del complejo Keap1/Nrf2 e incrementando la acumulación de Nrf2 y, por lo tanto, favoreciendo su fosforilación y posterior translocación al nú-

cleo. La segunda categoría son los *activadores directos no-electrofilicos*, que se unen directamente al dominio de unión a Nrf2 de Keap1, evitando la formación del complejo Keap1/Nrf2 [Chu et al., 2017]. Los antioxidantes fenólicos, como el 3-tert-butilhidroxianizol (BHA) y su metabolito activo desmetilado la tert-butilhidroquinona (tBHQ), son potentes inductores de genes de fase II regulados por Nrf2 [Kong et al., 2001]. Otros compuestos como el cadmio [Stewart et al., 2003], el dietilmaleato [Itoh et al., 2003] y el sulforafano [McMahon et al., 2000], por mencionar algunos, también son inductores indirectos de la expresión de genes dependientes de ARE/EpRE (Figura 2).

Por otro lado, cinasas como PKC [Huang et al., 2002] y PERK (*protein kinase-like endoplasmic reticulum (ER) kinase*) [Cullinan et al., 2003; Cullinan & Diehl, 2004] promueven la disociación del complejo Keap1/Nrf2 a través de fosforilaciones, evitando el reconocimiento de la proteína por el proteosoma [Nguyen et al., 2004]. Se ha propuesto que otras cinasas también pueden estabilizar al factor de transcripción Nrf2. Por ejemplo, la inhibición de MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/kinase extracellular signal-regulated kinase*) disminuye la activación de Nrf2 inducida por tBHQ en células HepG2 [Nguyen et al., 2003]; en tanto que el compuesto LY294002, inhibidor de la PI-3K (*fosfatidilinositol 3-kinase*) atenúa la estabilización de Nrf2 promovida por carnosol, lo que sugiere un posible papel de las MAPK/ERK y de PI-3K en la regulación del factor de transcripción [Martin et al., 2004]. En general, la fosforilación es importante para la activación de Nrf2 e involucra a diferentes proteínas cinasas, cada una de las cuales tal vez está asociada con la regulación de la actividad específica del factor de transcripción relacionadas a distintas cascadas de señalización.



**Figura 2** Inducción del factor de transcripción Nrf2. ERO: especies reactivas de oxígeno, P: fosforilación, SFN: Sulforafano.

### 3. ACTIVACIÓN DE Nrf2 EN DIVERSOS CONTEXTOS PATOLÓGICOS

La activación del factor de transcripción Nrf2 representa una oportunidad terapéutica para tratar enfermedades asociadas con aumento en el estrés oxidante. En este trabajo se describen dos aproximaciones experimentales diferentes a nivel cardíaco, para evaluar si la activación de este factor de transcripción evita el daño que ocurre por un lado en una patología neurodegenerativa asociada a disfunción cardíaca y, por otro lado, en el daño por isquemia y reperfusión cardíaca.

#### 3.1 Envejecimiento y Enfermedad de Huntington

El dramático incremento en el número de adultos mayores en las últimas décadas se asocia con el aumento en el número de hospitalizaciones y el déficit en los sistemas de salud pública, debido a la mayor susceptibilidad de esta población a desarrollar diferentes condiciones patológicas [Silva-Palacios et al., 2018]. Aunque se cree que el envejecimiento se debe a una pérdida gradual de la integridad genómica, proteómica y metabólica [Lewis et al., 2010], el mecanismo exacto que induce este deterioro aún se desconoce. El daño a la función mitocondrial y la sobreproducción de ERO fue una de las primeras propuestas consideradas desde los años 50's como un determinante causal del envejecimiento [Harman, 1956]. Sin embargo, muchos grupos de investigación han puesto en tela de juicio la validez de la Teoría del Envejecimiento acuñada por el Dr. Denham Harman, ya que los resultados experimentales son incompatibles con las premisas de dicha teoría [Buffenstein et al., 2008; Pérez et al., 2009a, b]. Sorprendentemente, tampoco existen datos que apoyen un vínculo directo entre la reducción de la función mitocondrial y la esperanza de vida [Deepa et al., 2018]. Por el contrario, el grupo de la Dra. Holly van Remmen ha mostrado que ratones *Sod2*<sup>+/-</sup> presentan una función mitocondrial comprometida, sin acelerar su proceso de envejecimiento [van Remmen et al., 2003]. Más aún, un estudio por Dell'agnello et al. [2007] reportó que ratones *Surf1*<sup>-/-</sup> incrementan su esperanza de vida a pesar de una reducción dramática en la actividad del complejo IV mitocondrial. Por otro lado, la forma en que las células responden a los cambios del entorno, la nutrición y el estilo de vida, también está definida por modificaciones en los genes que no se pueden atribuir a alteraciones de la secuencia de ADN. Estos cambios denominados epigenéticos, están regulados por variaciones en el estado redox [Jones, 2015]. Por lo que el interés en la función de las moléculas que producen o censan las variaciones redox en la célula, siguen generando un gran interés en el estudio de diferentes patologías y en el campo del envejecimiento.

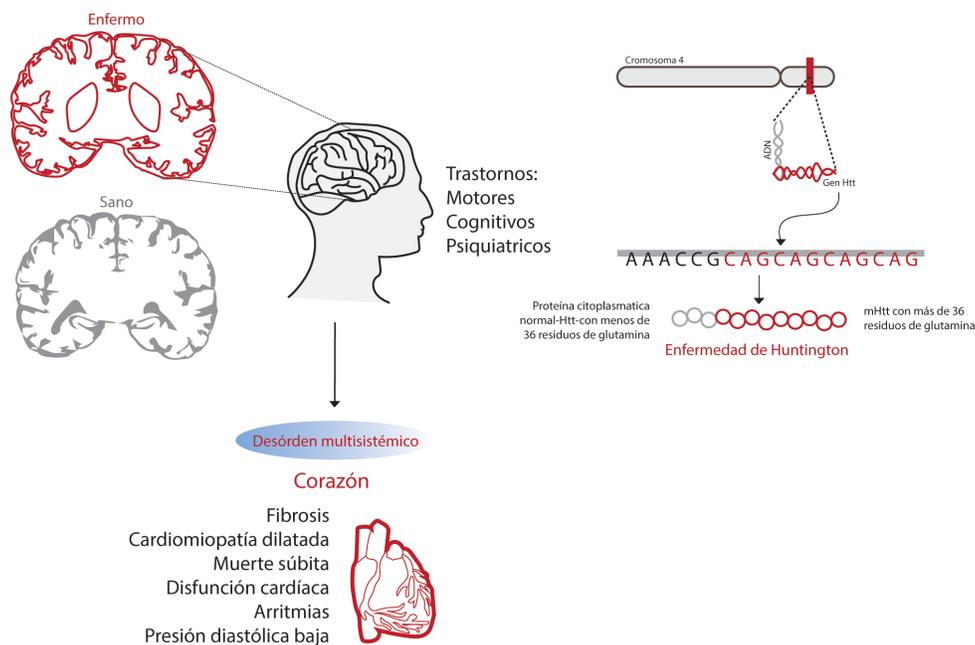
##### 3.1.1 Enfermedad de Huntington: ¿Desorden neurocardíaco?

La *enfermedad de Huntington (EH)* es un desorden neurológico cuya característica más conocida es la neurodegeneración prevalente en el núcleo estriado, los ganglios basales y la corteza cerebral (*Figura 3*), lo que produce síntomas neurológicos que engloban trastornos motores, cognitivos y psiquiátricos [Critchley et al., 2018]. Además, es resultado de la expansión patológica de repeticiones CAG (citosina-adeni-

na-guanina) trinucleótidas (que codifica a la poliglutamina, *poliQ*) en la *proteína huntingtina (Htt)* [Dinkova-Kostova et al., 2018]. Aunque la patología cerebral es el marcador mejor estudiado de la EH, la Htt se expresa en muchos otros tejidos y órganos en mamíferos [Strong et al., 1993]. Evidencias recientes sugieren que la disfunción cardíaca juega un papel importante en la progresión de la enfermedad, por lo que ha sido identificada como un desorden multisistémico [Mielcarek, 2015]. Sumado a ello, el tema de la edad en la EH es importante ya que, si los defectos celulares relacionados con el envejecimiento “normal” son factores de riesgo para la patología, podrían constituir objetivos terapéuticos interesantes para retrasar el inicio y progresión de la enfermedad [Diguët et al., 2009].

A la fecha no se conoce la función biológica de la Htt en el corazón ni en otros tejidos periféricos, incluyendo el sistema nervioso central [Moffitt et al., 2009]. La expansión del CAG en el gen Htt conduce a cambios estructurales en la proteína mutada, generando agregados proteicos. La relación entre la *Htt mutada (mHtt)* y la disfunción cardíaca se ha evaluado en diversos modelos animales (*Figura 3*). Por ejemplo, los ratones transgénicos con poliQ desarrollan insuficiencia cardíaca, ocasionando a los ratones muerte prematura (8 meses de edad) [Pattison et al., 2008]. En un estudio realizado por Melkani et al. [2013] usando a *Drosophila melanogaster*, se observaron arritmias e hipertrofia cardíaca junto con una disminución en la contractilidad. Otros grupos han descrito eventos cardíacos patológicos en animales pre-sintomáticos y en la etapa final de la enfermedad. Mielcarek et al. [2014a], observaron fibrosis e incremento de núcleos apoptóticos en cardiomiocitos de ratones pre-sintomáticos. En el modelo denominado BACHD (ratones que portan una construcción transgénica, *bacterial artificial chromosome (BAC)*), que cubre todo el gen humano de la mHtt [Clemensson et al., 2019]), se detectaron diferencias estructurales y funcionales en animales pre-sintomáticos desde los 3 meses de edad hasta su vejez (15 meses de edad). Además, los ratones jóvenes mostraron una sobre-regulación de la respuesta inmune pro-inflamatoria que contribuye a dichos cambios [Schroeder et al., 2016]. Recientemente, Joviano-Santos et al. [2019] demostraron que, cardiomiocitos provenientes de ratones BACHD (12 meses de edad) exhiben una marcada disfunción electromecánica asociada con estrés oxidante y severas arritmias. Los ratones *knock-in Q175* (que poseen una sola copia de la mutación en la posición 175 de la glutamina) desarrollan fibrosis en el septum interventricular y reducción del tamaño de los cardiomiocitos a medida que envejecen [Cutler et al., 2017]. Por otro lado, Wood et al., [2012] observaron cambios funcionales asociados con cardiomiopatía dilatada en ratones R6/2 (ratón transgénico que expresa el exón 1 del gen EH humano con aproximadamente 150 repeticiones CAG [Li et al., 2005]). Mientras que en el modelo *HdhQ150* (ratones en los que la mutación se inserta en el gen *Hdh*, que codifica para la huntingtina en ratón) con 150 repeticiones de glutamina [Menalled & Chesselet, 2002]) se apreció disfunción contráctil [Mielcarek et al., 2014b]. Finalmente, ratones R6/1 (ratón transgénico que expresa el exón 1 del gen EH humano con aproximadamente 115 repeticiones CAG [Li et al., 2005]) desarrollan bradi- y taquicardia, fibrilación auricular y muerte cardíaca súbita [Kiriazis et al., 2012].

A pesar de que los estudios epidemiológicos claramente identifican a la insuficiencia cardíaca como la segunda causa de muerte más común en estos pacientes (la primera es el suicidio), incluyendo a aquellos mayores de 60 años [Lanska et al., 1998; Zielonka et al., 2014], existen muy pocos estudios sobre las causas de la disfunción cardíaca en estos pacientes, dado que esta patología se ha descrito como un desorden exclusivamente neurológico. Sin embargo, se ha observado que en el suero de personas afectadas por la EH, incrementan los catabolitos de nucleótidos y disminuyen los niveles de adenosina [Toczek et al., 2016a]. Estos metabolitos representan los primeros biomarcadores identificados que se relacionan con la disfunción del músculo estriado en EH, en estudios pre-clínicos y clínicos. Además, este mismo grupo de investigación ha sugerido que la mHtt podría disminuir el metabolismo de nucleótidos a nivel transcripcional en el corazón [Toczek et al., 2016b]. De manera importante, la mHtt interactúa con genes reguladores como las desacetilasas de histonas (importantes para los cambios de expresión génica) en la EH y en algunas cardiomiopatías [Piotrowska et al., 2017]. Otro estudio clínico realizado por Stephen et al. [2015] en una cohorte de pacientes tempranamente sintomáticos, reveló disfunción cardíaca, bradicardia, y/o presencia del intervalo QT prolongado, lo que puede conducir a arritmias y a falla cardíaca. Cankar et al. [2018] reportaron un incremento en las variables del electrocardiograma avanzado (intervalo QT) en diferentes etapas de la enfermedad, asociado con arritmias ventriculares malignas. En otro estudio, Kobal et al. [2017] encontraron una rigidez arterial significativamente mayor en etapas tempranas y pre-sintomáticas de la enfermedad, así como un incremento en el espesor de la íntima media. Mientras que, en varios reportes con cohortes pequeñas de pacientes sintomáticos se reporta que éstos presentan actividad cardiovagal aumentada [Andrich et al., 2002], frecuencia cardíaca reducida [Melik et al., 2012] y presión diastólica baja [Kobal et al., 2010].



**Figura 3** Enfermedad de Huntington como un desorden multisistémico

### 3.1.2 Modelo farmacológico de la EH: ácido 3-nitropropiónico

Se ha propuesto que la disrupción del metabolismo energético mitocondrial es un mecanismo bioquímico común entre la exposición a ciertas toxinas ambientales y el inicio de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Por lo que los modelos excitotóxicos más comunes, como los de ácido kaínico, ácido iboténico y el ácido quinolínico, afectan la función mitocondrial induciendo muerte celular tras su instilación intracerebral [Gunčová et al., 2011]. El ácido 3-nitropropiónico (3-NP), compromete la función mitocondrial, reduce la producción de energía e induce de manera efectiva cambios neuroconductuales específicos y lesiones estriatales selectivas en ratas y primates no humanos que imitan a los de la EH [Lee & Chang, 2004; Hariharan et al., 2014] por lo que es un modelo farmacológico muy utilizado de esta enfermedad. Los animales tratados con 3-NP presentan rápidamente anormalidades motoras específicas y déficit cognitivo (incluyendo déficit de memoria). Estas anomalías de comportamiento incluyen bradicinesia, hipoactividad seguido de hiperactividad y, finalmente, recumbencia en la condición más grave. Dichos cambios de comportamiento surgen debido a las lesiones selectivas del estriado producidas por 3-NP [Beal et al., 1993a; Brouillet et al., 1993; Borlongan et al., 1997; Alexi et al., 1998; Brouillet et al., 1998, 1999; Lee & Chang et al., 2004].

#### 3.1.2.1 Breve historia del ácido 3-nitropropiónico

El 3-NP y sus derivados son nitrocompuestos alifáticos universalmente distribuidos en plantas tóxicas como *Astragalus* e *Indigofera endecaphylla* identificadas en 1954 [Alston et al., 1977; James et al., 1980]. Sin embargo, no fue hasta los años 80's, en que se reportó que la ingesta de caña de azúcar contaminada con el hongo *Arthrimum* era la responsable del desarrollo de una encefalopatía aguda en niños, generándoles necrosis simétrica bilateral de los ganglios basales y -en algunos individuos- distonía irreversible [Hu, 1986; He, 1987; He et al., 1995]. El almacenamiento en condiciones de humedad promueve el crecimiento fúngico en el cuerpo de la caña y quienes consumen dicha planta, pueden desarrollar síntomas gastrointestinales, pero raramente desórdenes del SNC; sin embargo, los niños pueden mostrar signos de una severa encefalopatía [Sabri et al., 2000]. En su momento, se informó de más de 884 casos después de la intoxicación con la caña contaminada, de los cuales 88 murieron por intoxicación [He, 1987]. La característica clínica primaria de todos los casos fue irritación gastrointestinal con un inicio abrupto. La afectación del SNC generalmente se manifestó como pérdida de la conciencia, convulsiones frecuentes, reflejos plantares extensores o anomalías en el electroencefalograma, lo que indicaba encefalopatía [Liu, 1986]. En pacientes moderadamente afectados, mirada forzada hacia arriba, desviación conjugada de los ojos y movimiento incontrolable e involuntario de los ojos (nistagmo) son hallazgos frecuentes. En casos graves, el desarrollo de distonía retardada es una característica común. Las particularidades del síndrome distónico después de la encefalopatía aguda inducida por la caña de azúcar con moho son: aparición de coma, retraso en la aparición de distonía luego de recuperar la consciencia, movimientos involuntarios dramáticos, muecas faciales, atetosis sostenida, tortícolis espasmódica, espasmos de torsión, movi-

mientos bruscos que asemejan a la corea o espasmos paroxísticos dolorosos en las extremidades y afasia motora o disartria no progresiva e irreversible. El análisis de escaneo en pacientes distónicos indicó hipodensidades bilaterales en el núcleo lenticular (mayormente en el putamen y en menos cantidad en el globo pálido), lo que probablemente explica los síntomas extrapiramidales [He, 1987; Ludolph et al., 1991].

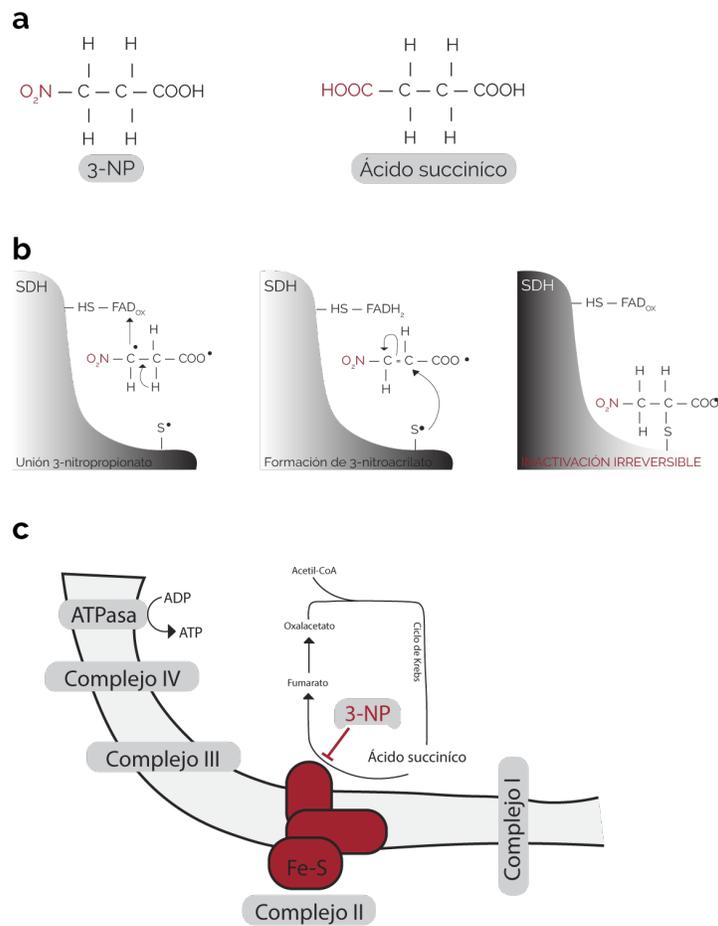
### 3.1.3 Mecanismo de acción del ácido 3-nitropropiónico

Tras ser administrado *in vivo* de forma oral o sistémica, el 3-NP compromete la función mitocondrial y reduce la producción de energía, además de causar lesiones estriatales semejantes a las encontradas tanto en roedores con la mHtt [Brouillet et al., 1999; Brouillet, 2014], como en pacientes con Huntington [Gu et al., 1996]. Selectivamente, causa la degeneración de neuronas espinosas medianas en el estriado, las cuales constituyen del 90-95% de todas las neuronas estriatales [Gu et al., 1996], lo anterior sumado a la toxicidad cardiaca [Gabrielson et al., 2001; Hernández-Echeagaray et al., 2011].

La estructura química del 3-NP es isoelectrónica al sustrato de la succinato deshidrogenasa (SDH) (*Figura 4a*); por lo tanto, inhibe la actividad de este complejo mitocondrial. En la cadena respiratoria normal, la enzima SDH oxida el succinato a fumarato y sirve como punto de entrada de electrones a la cadena respiratoria a nivel del ubiquinol durante la síntesis de ATP (*Figura 4c*) [Alexi, 1998]. La SDH, también llamada complejo II (CII) de la CTE, se compone de una gran subunidad de flavoproteína que contiene un flavín adenín dinucleótido unido covalentemente a la proteína, tres diferentes centros Fe-S y dos pequeñas subunidades de anclaje de membrana (cadena C y D) ligando un único grupo hemo de tipo B [Huang et al., 2006]. Alston et al. [1977] propusieron que el nitrógeno (N5) de la flavina interactúa con el 3-NP formando un aducto estable, inactivando al complejo permanentemente (*Figura 4b*). Sin embargo, también se ha descrito que la forma dianión del 3-NP se une a la SDH produciendo su forma oxidada (3-nitroacrilato) y que éste puede actuar de dos maneras: (a) reaccionando con una cisteína esencial de la SDH, bloqueando irreversiblemente su actividad [Alexi, 1998] y (b) reaccionando con la Arg<sup>297</sup> en el sitio activo de la SDH, formando un aducto cíclico que inactiva al complejo II [Huang et al., 2006].

En el cerebro, los eventos celulares generados por el 3-NP se describen en la *Figura 5*. Tras la inhibición de la SDH con 3-NP en la mitocondria, se induce la depleción de ATP previniendo la salida de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> de las neuronas, conllevando a la despolarización de las células. La pérdida del potencial de membrana remueve al Mg<sup>2+</sup> que mantiene bloqueado a los receptores NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) permitiendo la entrada de calcio [Beal et al., 1993b; Lee & Cheng et al., 2004]. El Ca<sup>2+</sup> extracelular puede también entrar a las células vía receptores no-NMDA, tal como receptores AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate*) y los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). El influjo de calcio extracelular induce un marcado incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el cual conduce a la producción de ERO y óxido nítrico (NO), vía la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS) [Brouillet, et al., 2005]. El NO, secundario a la activación de la NOS, puede reaccionar con el anión superóxido formando peroxinitrito (ONOO•), el cual disminuiría

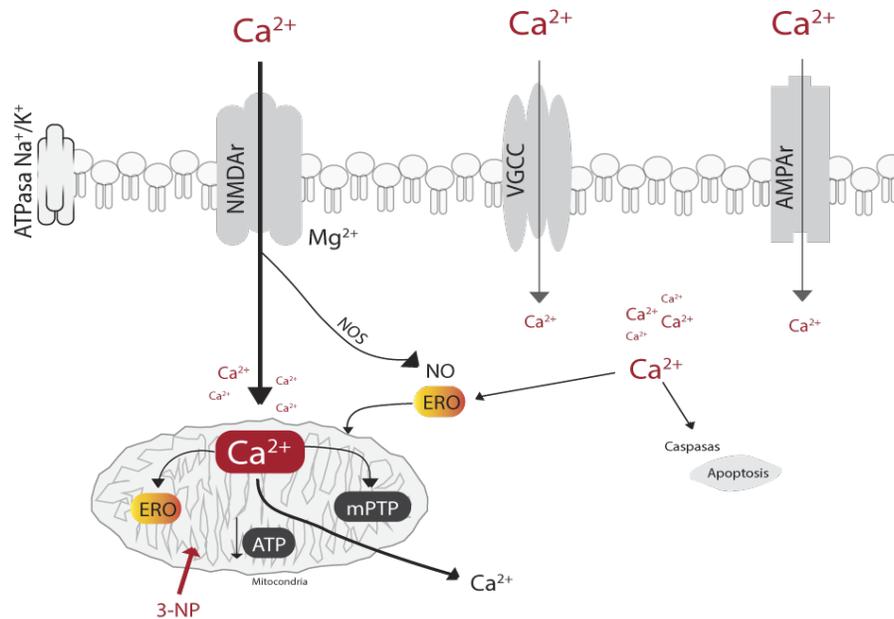
aún más el contenido de ATP celular [Lee & Chang, 2004]. El  $\text{Ca}^{2+}$  puede entrar a la mitocondria, conduciendo a una mayor producción de ERO, depleción de ATP y la inducción del poro de la transición mitocondrial (mPTP) [Pang & Geddes, 1997]. La inducción de dicho poro resulta en la liberación de citocromo c junto con la subsecuente activación de las caspasas; en tanto, las calpaínas inducen el rompimiento de una gran cantidad de proteínas, todo lo cual produce daños irreversibles y eventualmente la muerte neuronal [Brouillet et al., 2005; Túnez et al., 2010]. Además, el 3-NP tiene la capacidad de disminuir la actividad del complejo III mitocondrial (CIII) [Bacsi et al., 2006; Orozco-Ibarra et al., 2016]. Pandey et al. [2008] demostraron que el complejo I mitocondrial (CI), también es susceptible al 3-NP en neuronas. Por lo tanto, la inhibición de ambos complejos, conllevaría a una sobreproducción de ERO, potencializando el daño a mitocondrias y promoviendo la muerte celular.



**Figura 4 Mecanismo de acción del ácido 3-nitropropiónico. (a)** Comparación de la estructura química entre el 3-NP y el ácido succínico. **(b)** Mecanismo de la inactivación de la SDH. **(c)** Ubicación de la SDH en la CTE y el ciclo de Krebs.

Aunque el mecanismo de daño por 3-NP no es del todo claro en el sistema cardiovascular, se ha reportado un incremento en la generación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  inducida por Antimicina-A en presencia de sustratos del CI y una

disminución de la oxidación de sustratos del CII. Por otro lado, Bacsí et al. [2006] señalan que la generación del  $O_2^{\bullet-}$  está localizada en el sitio entre la poza de ubiquinol y el bloqueo por 3-NP en el CII. Además, el 3-NP induce la apertura del mPTP [Mirandola et al., 2010] e inhibe el consumo de oxígeno en mitocondrias cardíacas aisladas [Lopez et al., 1998]. En general, la neurodegeneración, e incluso la cardiotoxicidad, inducidas por el 3-NP dan lugar a déficit energético, excitotoxicidad y EO [Liot et al., 2009; Cho & Kim, 2015].

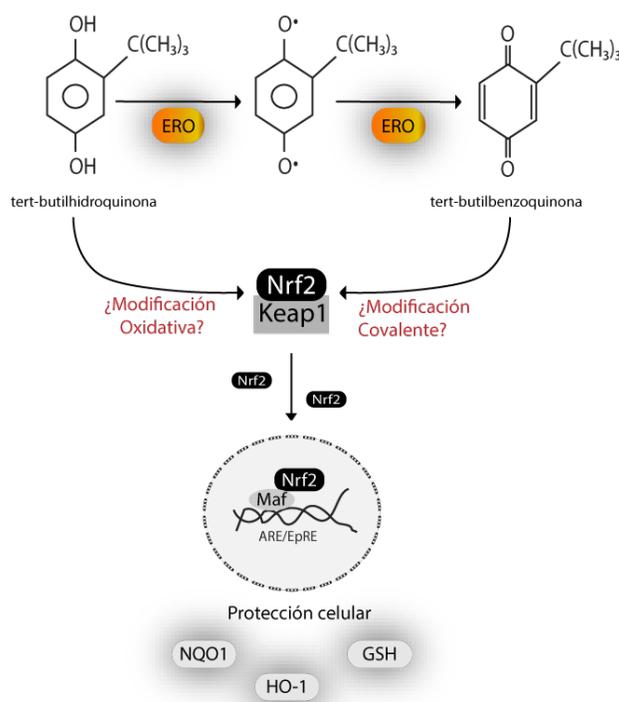


**Figura 5** Eventos celulares relacionados con la toxicidad inducida por el ácido 3-nitropropiónico. En cerebro y corazón estos eventos incluyen: la perturbación de la homeostasis del calcio, el incremento en las ERO y la producción de NO, la activación de caspasas, la sobrecarga de calcio mitocondrial y la apertura del mPTP, lo que induce daño y subsecuentemente la muerte celular.

### 3.1.4 Sobrevivencia celular: Papel del Nrf2

Como hemos descrito en la primera parte, el Nrf2 regula aproximadamente 250 genes involucrados en la homeostasis celular [O'Connell & Hayes, 2015]. La disminución de la respuesta antioxidante dependiente de la edad se relaciona con una translocación nuclear reducida y/o pérdida de la estabilidad de Nrf2 [Safdar et al., 2010; Silva-Palacios et al., 2016]. Interesantemente, algunos reportes indican que el ejercicio [Gounder et al., 2012], el tratamiento con ácido  $\alpha$ -lipoico [Suh et al., 2004] y el tBHQ [Alarcón-Aguilar et al., 2014] restauran los niveles nucleares de Nrf2 en diferentes modelos. Por lo que no es sorprendente que investigaciones recientes centren su atención en la identificación de moléculas activadores de la vía Keap1/Nrf2. Muchas de ellas incluyen al sulforafano [Bai et al., 2015], ácido cafeico [Lee et al., 2010], curcumina [Correa et al., 2013], resveratrol [Kim et al., 2018] y tBHQ [Alarcón-Aguilar et al., 2014]. La naturaleza protectora de éste último se ha evaluado en diversos modelos patológicos [Pérez-Rojas et al., 2011; Fu et al., 2018]. El BHA es un compuesto fenólico ampliamente usado como un conservador en la

industria alimentaria para preservar aceites y grasas [Abiko et al., 2011]. Una rápida *O*-desalquilación por las isoenzimas del citocromo P450 conducen a la producción del tBHQ [Verhagen et al., 1989]. Entre sus propiedades, la capacidad antioxidante del tBHQ brinda protección a animales y líneas celulares contra el daño oxidante, radiación y toxicidad de varios xenobióticos [Pérez-Rojas et al., 2011]. Varias líneas de evidencia sugieren que tBHQ puede activar al factor de transcripción Nrf2, cuya activación y la subsecuente sobre-regulación de sus genes blanco durante la exposición a tBHQ son atribuibles a la formación de bajos niveles de ERO (particularmente  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ ) [Gharavi et al., 2007]. Sin embargo, Dinkova-Kostova & Wang [2011] reportaron que el tBHQ por sí mismo no activa a Nrf2; más bien, su producto de oxidación (tert-butilbenzoquinona, tBQ) es quien lo induce debido a sus propiedades electrofílicas [Wang et al., 2010] (Figura 6).



**Figura 6 Inducción de Nrf2 por tert-butilhidroquinona.** El BHA sufre una *O*-desalquilación por las isoenzimas de citocromo P450 produciendo tBHQ, el cual se auto-oxida a tBQ. Las reacciones redox en la conversión de tBHQ a tBQ, conducen a la producción de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ . Tanto la modificación oxidativa como la covalente, son las dos de las propuestas que explican la activación de Nrf2.

## 3.2 Isquemia-Reperfusión cardiaca

Otro fenómeno asociado al aumento en las ERO, y en el que podría participar Nrf2, es la isquemia-reperfusión (I/R). Este fenómeno subyace a muchos trastornos, especialmente al infarto agudo al miocardio (IAM). La lesión por I/R ocurre al interrumpir el suministro de sangre a un órgano; si bien la reperfusión del tejido isquémico es esencial para la supervivencia, también favorece la muerte celular a través de la generación de ERO mitocondriales [Pell et al., 2018]. El interés creciente en entender los mecanismos que engloban al daño por I/R, es dar pie a desarrollar herramientas que lo prevengan. En este sentido, la modulación de la producción de las ERO ha sido implicado como un mecanismo clave en la cardioprotección. Sin embargo, las estrategias basadas en antioxidantes han tenido una aplicación limitada (o casi nula) en los estudios clínicos [Rodrigo et al., 2014; Ekeloef et al., 2017], lo que se ha explicado en base a su impermeabilidad celular o acción espacio-temporal inadecuada [Penna et al., 2009]. Para sobreponer esta limitación, una estrategia alternativa ha sido estimular la respuesta antioxidante celular endógena. A este respecto, breves episodios no letales de I/R protegen contra los efectos deletéreos de la reperfusión; fenómeno conocido como *acondicionamiento isquémico*, estudiado en el corazón y en otros órganos [Cabrera-Fuentes et al., 2016; Hausenloy et al., 2016]. El acondicionamiento isquémico protege al miocardio vía la activación de *cinastas de señalización contra el daño por reperfusión* (RISK, *reperfusion injury salvage kinase*) las cuales han sido extensamente estudiadas en cardiomiocitos [Frohlich et al., 2013]. Un estímulo particular que propicie el acondicionamiento de órganos como el corazón, podría involucrar programas moleculares que produzcan tolerancia duradera (>24 hrs) contra la lesión isquémica. Sin embargo, la cardioprotección conferida por dicha estrategia, es un complejo sistema de sucesos cuyos mecanismos aún no se han resuelto totalmente [Hernández-Reséndiz et al., 2018b].

### 3.2.1 Eventos celulares en la isquemia-reperfusión

En su manifestación clásica, la privación del suministro de sangre puede provocar daño tisular al corazón debido a la falta de oxígeno y nutrientes necesarios para la producción de energía [Paradies et al., 2018]. La *isquemia* resulta en la pérdida de la función contráctil del corazón y el daño miocárdial [Gottlieb, 2011]. En tanto, la *reperfusión* oportuna restaura el flujo sanguíneo, el suministro de oxígeno y nutrientes, mejorando la función contráctil post-infarto y la sobrevivencia de los pacientes [Dongworth et al., 2014]. Paradójicamente, esta intervención podría resultar en inflamación y daño oxidante [Yellon & Hausenloy, 2007; Eltzschig & Eckle, 2011] conduciendo a la muerte de los cardiomiocitos y una subsecuente lesión miocárdial irreversible, fenómeno comúnmente llamado *daño por reperfusión* [Paradies et al., 2018].

#### 3.2.1.1 Isquemia

En los roedores, el infarto ocurre entre los 30 a 60 min de isquemia; mientras que, en el humano se establece a partir de los 20 a 40 min y puede desarrollarse entre las 8 y 12 horas [Schöming et al., 2005]. Se-

senta segundos sin flujo sanguíneo, son suficientes para agotar las reservas de fosfatos de alta energía en forma de creatina cinasa activada por AMP (AMPK), que estimula la producción de ATP a través de la vía anaerobia para mantener la función de los canales iónicos [Paradies et al., 2014]. El cambio del metabolismo hacia la glucólisis anaerobia, conduce a la acumulación de lactato y a la acidificación citosólica (de  $\approx 6.6$  a  $5.8$  de pH) [Gottlieb, 2011]. En general, al incrementar el tiempo de la isquemia, se da una pérdida del funcionamiento de bombas y canales iónicos así como una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cardiomiocitos (estado de hipercontractura) [Maack & O'Rourke, 2007]. Además, dicha sobrecarga contribuye a la alteración de la membrana plasmática y, finalmente, a la necrosis celular [Piper et al., 2006] (*Figura 7*). A este respecto, un estudio reciente destaca la importancia del flujo de calcio mitocondrial vía el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , cuya ablación conduce a una repentina muerte [Luongo et al., 2017]. A pesar de la ausencia de oxígeno y nutrientes, el pH ácido mantiene cerrado el mPTP, cuya apertura se relaciona con la muerte celular [Crompton et al., 1999] y con el inicio de cascadas apoptóticas debidas a la liberación de citocromo c desde la mitocondria [Zhang et al., 2016].

### 3.2.1.2 Reperusión

La restauración oportuna del flujo coronario es un requisito indispensable para salvar al miocardio del infarto, ya que permite corregir los cambios metabólicos ocurridos durante la isquemia [Silva-Palacios et al., 2016]. A nivel celular, la reperusión temprana re-establece el pH extracelular debido al lavado de  $\text{H}^+$  y ácido láctico, este evento favorece la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y, por lo tanto, la entrada de  $\text{Na}^+$ . El  $\text{Na}^+$  es eliminado vía la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y por el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , lo que hace que se acumule el  $\text{Ca}^{2+}$  que puede contribuir a la lesión por reperusión [Boengler et al., 2018]. (*Figura 7*).

### 3.2.1.3 Lesión por reperusión

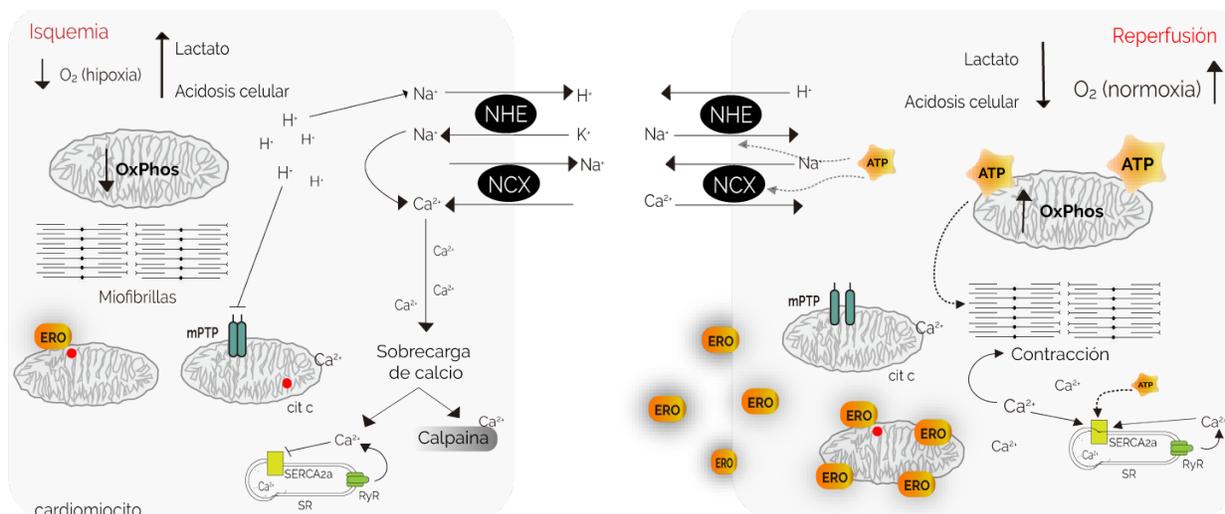
Los cambios metabólicos y estructurales deletéreos que potencialmente pueden inducir muerte celular, como consecuencia de la re-apertura del segmento epicárdico de la arteria relacionada con el infarto, se conocen como *daño por reperusión*. Luego de la entrada de oxígeno y nutrientes, el aumento en la disponibilidad de ATP y la restauración del pH favorecen los eventos deletéreos en dicha lesión [Paradies et al., 2018]:

- A. *Estrés oxidante*: La reducida disponibilidad de oxígeno durante la isquemia altera la OxPhos conduciendo a la despolarización de la mitocondria, la depleción de ATP e inhibición de la función contráctil. En ratas con isquemia, la generación de ERO se incrementa rápidamente debido a la re-entrada de sangre oxigenada [Zhu & Zuo, 2013]. Alrededor del 0.2-2% del oxígeno absorbido por las células se convierte en ERO [Boveris et al., 1972; Chen & Zweier, 2014]. De hecho, valores de  $6.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$  durante la isquemia y un aumento durante la reperusión ( $11.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ) vs. un grupo control ( $4.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), fueron los primeros en ser reportados [Zweier et al., 1987]. Aunque el

CI y el CIII generalmente se consideran los principales sitios de producción de ERO en el daño por reperfusión, estudios recientes sugieren que el CII puede ser un sitio adicional de producción de dichas especies. Chouchani et al. [2014] demostraron que, la producción de  $O_2^{\cdot-}$  ocurre debido a la acumulación de succinato y su rápida oxidación por el transporte de electrones reverso al comienzo de la reperfusión [Quinlan et al., 2012]. Además, la inhibición de la SDH preserva la función mitocondrial y reduce la lesión por I/R en el miocardio [Valls-Lacalle et al., 2016].

- B. *Sobrecarga de  $Ca^{2+}$* : La activación de la bomba dependiente de ATP del SR o SERCA, temporalmente puede secuestrar y almacenar el  $Ca^{2+}$  en exceso; sin embargo, si la concentración de calcio rebasa la capacidad del SR, inicia un ciclo de liberación y re-captación de este ion causando un estado de hipercontractura de las miofibrillas [Luongo et al., 2017]. Durante la I/R, un incremento de  $Ca^{2+}$  citosólico conduce la entrada del ion en la mitocondria a través del uniportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial (MCU,  $[Ca^{2+}]_{mit}$ ) llevando a la activación del mPTP y, posteriormente, a la muerte por necrosis [Hunter & Haworth, 1979; Griffiths & Halestrap, 1993]. Recientemente, se ha descrito que ratones *knock out* de MCU ( $MCU^{-/-}$ ) [Pan et al., 2013] o que expresan un MCU dominante específico de corazón [Rasmussen et al., 2015] no se protegen del daño por reperfusión. Además, Parks et al. [2018] indicaron que mitocondrias  $MCU^{-/-}$  incrementan la fosforilación de CypD-S42, disminuyendo la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  y permitiendo la activación del mPTP en ausencia de un aumento del calcio en la matriz.
- C. *Apertura del mPTP*: El mPTP es un poro de gran conductancia [Boengler et al., 2018] cuya apertura ocurre al inicio de la reperfusión [Morciano et al., 2017] induciendo hasta un 40% de la muerte celular [Di Lisa et al., 2001]. La sobrecarga de  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , ERO, pH alto y un potencial de membrana bajo son factores que favorecen su apertura [Boengler et al., 2018] contribuyendo, incluso, al desensamblaje de supercomplejos de la CTE e incrementando la formación de ERO durante la I/R [Jang et al., 2017; Ramírez-Camacho et al., 2018]. Desde hace 30 años, la ciclosporina A es usada como un regulador de su apertura [Crompton et al., 1988]. Sangliferina-A [Argaud et al., 2005], Debio-25 [Gomez et al., 2007] y NIM811 [Lim et al., 2007] también protegen contra la lesión por reperfusión, inhibiendo al mPTP.
- D. *Inflamación*: La respuesta inflamatoria juega un papel crítico en el incremento del tamaño del infarto y el subsecuente remodelamiento del ventrículo izquierdo (LV, *left ventricle*) post-infarto [Ong et al., 2018]. El papel preciso de la inflamación al comienzo del infarto ha sido debatido desde los años 80's [Engler & Covell, 1987]. Al inicio de la isquemia, se induce una respuesta pro-inflamatoria, mientras que en la reperfusión se exagera contribuyendo a la muerte del cardiomiocito y daño al miocardio que se manifiesta entre las 6 y 24 h post-reperfusión [Zhao et al., 2000; 2001]. Iniciada la respuesta pro-inflamatoria a través de la acción concertada de varios procesos, incluyendo la producción de ERO en los primeros 2 a 10 min de la reperfusión [Vinten-

Johansen, 2004], resulta en la liberación de citocinas, quimiocinas y neutrófilos en la región isquémica [Hernández-Reséndiz et al., 2018a; Ong et al., 2018]. La estimulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) lleva a cabo la expresión de interleucinas como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-18 (IL-18) iniciando la respuesta inflamatoria [Toldo et al., 2018]. En modelos experimentales, la IL-1 $\alpha$  es liberada de los cardiomiocitos dañados, mientras que la IL-1 $\beta$  se sobre-regula después del infarto. Por ejemplo, tanto la inhibición genética como la farmacológica de la IL-1, han mostrado reducir el tamaño del infarto y prevenir el remodelamiento del LV [Abbate et al., 2008]. La IL-6 (con papeles pro- y anti-inflamatorios) se libera después de la I/R [Gwechenberger et al., 1999], cuya modulación ha dado resultados controversiales. Por ejemplo, los ratones deficientes en IL-6 mantienen un área infartada similar [Fuchs et al., 2003] o incluso más pequeño [Jong et al., 2016] comparado con un ratón *wild type*. De forma similar, Hartman et al. [2016] mostraron que la administración del anti-cuerpo del receptor de IL-6 (MR16-1) antes de la reperfusión, aumentó la remodelación del LV.



**Figura 7. Eventos celulares en la isquemia/reperfusión.** La formación y crecimiento de la placa ateromatosa genera un evento isquémico. Las alteraciones incluyen reducción del flujo sanguíneo y, por consecuencia, la reducción de nutrientes y la disponibilidad de oxígeno, favoreciendo la activación de la glucólisis anaerobia (principal fuente productora de ATP). La acumulación de lactato y protones ( $H^+$ ) proveniente de la hidrólisis del ATP produce acidosis celular. El incremento intracelular de  $H^+$  activa al intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE); este mecanismo y la inactivación de la  $Na^+/K^+$  ATPasa incrementan los niveles de  $Na^+$  en el citoplasma. Finalmente, en respuesta a la sobrecarga de  $Na^+$ , el intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) expulsa el sodio a costa de introducir  $Ca^{2+}$  a la célula. La reperfusión oportuna corrige los cambios metabólicos deletéreos que se echaron a andar durante la isquemia, como la acidosis, al favorecer la actividad del intercambiador NHE y, por lo tanto, la entrada de sodio. En presencia de oxígeno se reactiva la OxPhos facilitando la síntesis de ATP, en presencia del cual el sodio citosólico es regulado por la  $Na^+/K^+$  ATPasa o por el intercambiador NCX. SR: retículo sarcoplásmico, RyR: receptores de rianodina. SERCA: bomba de ATPasa de  $Ca^{2+}$  del SR. cit c: citocromo c [Modificado de Silva-Palacios et al., 2016].

### 3.2.2 Consecuencias clínicas del daño por reperfusión

En la clínica, las consecuencias más críticas se clasifican como reversibles (arritmias y aturdimiento miocárdico) e irreversibles (fenómeno de no-reflujo e incremento del tamaño del infarto). El *miocardio atur-*

*did* se define como la disfunción mecánica temporal, pero con flujo sanguíneo normal. El *no-reflujo* o la obstrucción microvascular, es el término usado para describir la perfusión inadecuada de un segmento coronario sin que haya evidencia angiográfica de la obstrucción del vaso, cuya incidencia favorece la remodelación cardíaca y la re-incidencia del infarto [Reffellmann & Kloner, 2006]. Finalmente, el *tamaño del infarto* corresponde a la fracción de tejido necrótico que suma la muerte producida durante la isquemia y la reperfusión.

### 3.2.3 Estrategias terapéuticas para aumentar la tolerancia a la isquemia

#### 3.2.3.1 Acondicionamiento isquémico

Originalmente propuesto por Murry et al. [1986] en un modelo canino, el *pre-acondicionamiento isquémico (IPC)* es una de las formas más robustas y reproducibles de la cardioprotección ya que significativamente atenúa la muerte miocárdica producida por la reperfusión. Desde su descripción inicial, se ha mantenido un interés sostenido en desentrañar sus mecanismos, con la esperanza de imitar farmacológicamente sus efectos benéficos. Sin embargo, y a pesar de la extensa investigación, nuestro entendimiento del mecanismo preciso del IPC aún está incompleto [Bøtker et al., 2018]. Periodos cortos y no letales de isquemia dan como resultado una lesión tisular atenuada durante la reperfusión posterior, la cual es la base principal del IPC. Sin embargo, y pese a sus efectos benéficos, en la clínica no se han logrado reproducir los efectos protectores del tejido pre-acondicionado observado en animales [Petrowsky et al., 2006]. Los episodios cortos de isquemia aplicados antes de la reperfusión, denominado *post-acondicionamiento (PostC)*, se asocian con una reducción del tamaño del infarto en el miocardio (*Figura 8*). A este respecto, un estudio piloto, prospectivo, aleatorizado, controlado y multicéntrico demostró que el PostC protege al corazón durante la angioplastia coronaria después de un IAM [Staat et al., 2005], asociado con una mejora en la función cardíaca hasta un año después del infarto [Thibault et al., 2008]. Pese a la extensión del concepto del PostC [Zhao et al., 2003] junto con, literalmente miles de estudios experimentales en varias especies y modelos que identificaron una multitud de cascadas de señalización [Heusch, 2015], hasta ahora solo un estudio reciente ha logrado demostrar de manera inequívoca la cardioprotección en pacientes [Gaspar et al., 2018].

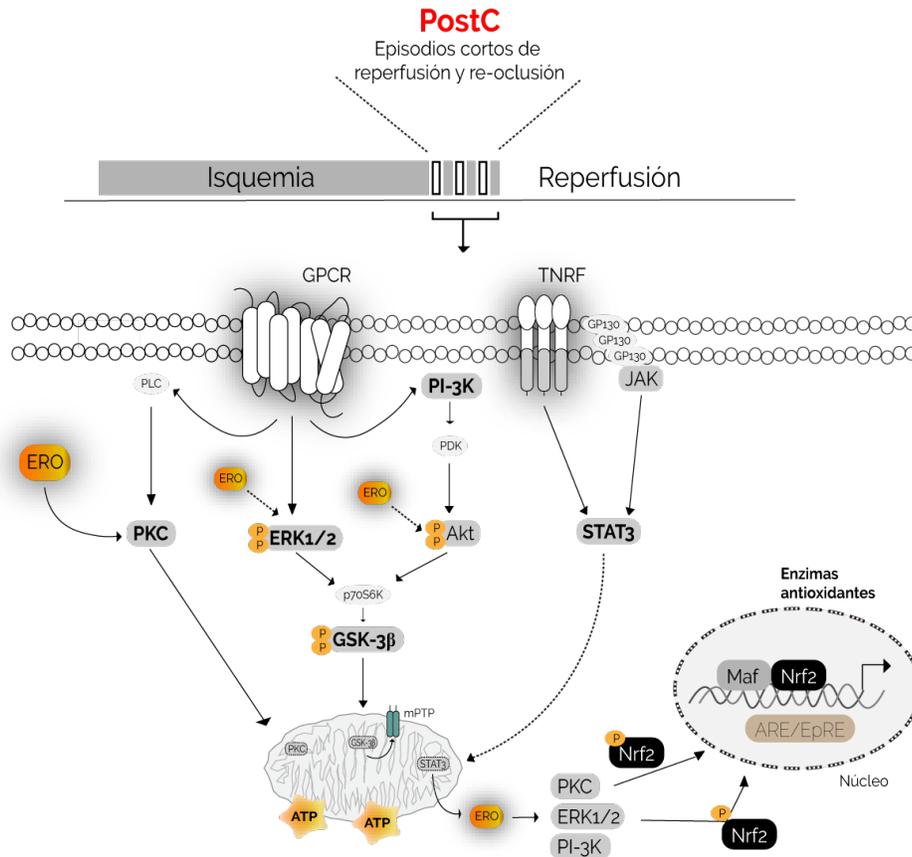
#### 3.2.3.2 Papel de las RISK y el factor de transcripción Nrf2

La disminución de la lesión por reperfusión mediante intervenciones mecánicas y farmacológicas conlleva a la cardioprotección [Rosenberg et al., 2018]. El acondicionamiento farmacológico previene la apertura del mPTP y limita la disrupción mitocondrial [Iliodromitis et al., 2015]. El pre-acondicionamiento resulta en dos *ventanas de protección*; la primera ocurre de forma natural y transitoria después de 2 a 3 hrs del estímulo. La segunda ocurre 24 hrs después y dura aproximadamente 48 hrs debido a la producción de proteínas citoprotectoras [Heusch, 2013; 2015]. La *fase temprana* de la protección se induce a través de la

mitocondria, donde las ERO actúan como moléculas de señalización activando proteínas cinasas como Akt (*serine/threonine kinase*), ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), tirosina cinasas y PKC. Mientras que, la *fase de protección tardía* se debe a la activación de factores de transcripción por estas cinasas, así como el reclutamiento de vías de señalización para atenuar el tamaño del infarto. Las dos principales rutas de pro-sobrevivencia son las RISK (que actúa a través de Akt y ERK1/2) y la ruta SAFE (*survivor activator factor enhancement pathway*) que se potencia a través de la cinasa activada por Janus (JAK) y STAT3 (*transducer and activator of transcription 3*) para reducir la lesión por reperfusión [Ibáñez et al., 2017] (*Figura 8*). Hausenloy & Yellon [Hausenloy et al., 2005], popularizaron el estudio de la ruta RISK al destacar sus efectos cardioprotectores a través de su activación por muchos agentes [Ong et al., 2015]. Por ejemplo, la estimulación de receptores acoplados a proteínas G activan a PI-3K, resultando en la fosforilación de Akt, GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*), NOS endotelial, PKC y Bcl-2. Diversos trabajos indican que la inhibición de cinasas, impactan en la cardioprotección. Por ejemplo, el uso de queleritrina (inhibidor de PKC), así como la administración de Wortmanina y LY294002 (inhibidores de PI-3K) anulan la cardioprotección del PostC [Rana et al., 2015]. La cardioprotección dada por el IPC se ha relacionado con la activación tanto de las RISK, así como del factor de transcripción Nrf2 (*Figura 8*). Por ejemplo, Zhang et al. [2013] evidenciaron la participación de PKC en la señalización de Nrf2 en un modelo *ex vivo*. Datos de nuestro grupo de trabajo, indican que este mismo mecanismo de protección se induce en la maniobra del PostC [Buelna-Chontal et al., 2014].

### 3.2.3.3 Sulforafano

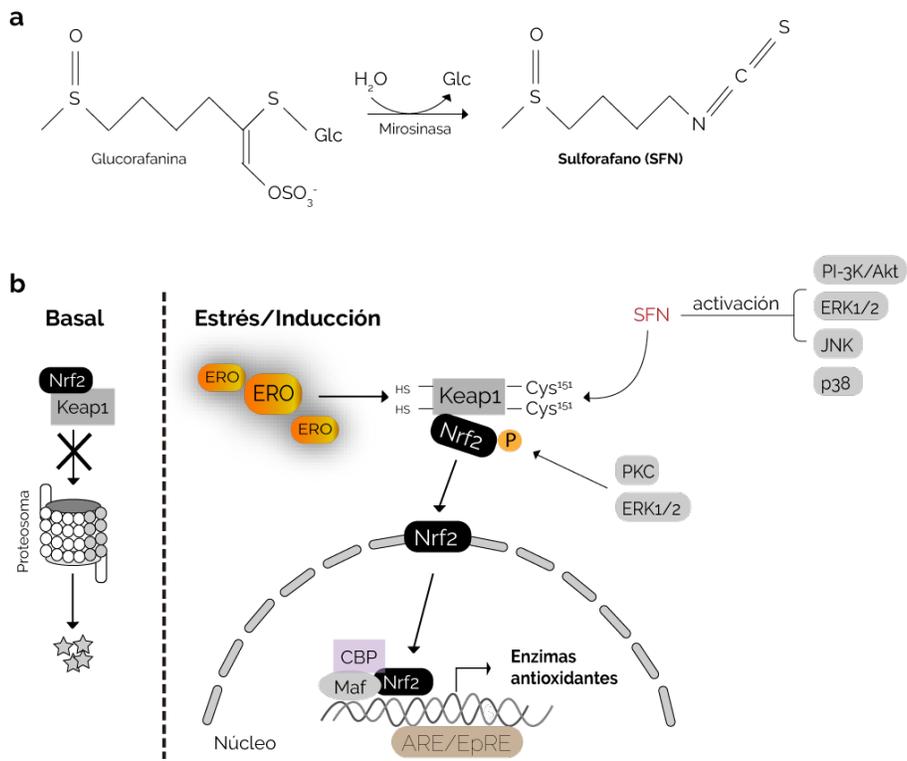
La activación de Nrf2 en este contexto, no solo se induce tras estas estrategias, sino que también funciona usando agentes exógenos con propiedades antioxidantes o bien moduladoras del estado redox. Particularmente, el sulforafano (SFN, *1-isothiocyanato-(4R)-(methylsulfinyl butane)*) es una molécula lipófila alifática pequeña [Houghton et al., 2016]. Su precursor inactivo, la glucorafanina (Grn) y la enzima mirosinasa se encuentran en las plantas del género *Brassica*. Cuando la célula se rompe, la enzima convierte la Grn en SFN [Botti et al., 1995] (*Figura 9a*). El brócoli no solo es el único crucífero que produce SFN, pero si las cantidades más altas de Grn (alrededor 0.8-21.7  $\mu\text{mol/g}$ ) [Clarke et al., 2011]. En general, después de la conversión de glucosinolatos por la mirosinasa, los isotiocianatos se metabolizan a través de la ruta del ácido mercaptúrico. Al inicio, los isotiocianatos se conjugan con GSH en una reacción catalizada por GST. Le siguen reacciones de escisión sucesivas catalizadas por la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa, cisteinilglicinasa y *N*-acetiltransferasa para producir SFN-*N*-acetilcisteína [Vanduchova et al., 2019].



**Figura 8** Cascadas de señalización activadas por el post-acondicionamiento isquémico. GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G, TNFR: Receptor de factor de necrosis tumoral.

Las propiedades del SFN incluyen su capacidad de incrementar la expresión de enzimas antioxidantes y de fase II, así como la inhibición de la inflamación en diferentes contextos, incluyendo la I/R [Piao et al., 2010; Bonetto et al., 2016]. El SFN pertenece a una de las nueve clases de activadores químicos de Nrf2 [Dinkova-Kostova et al., 2004]; una de las características más importantes de esta molécula, es su alta reactividad química debido a la electrofilicidad del carbono central del grupo isotiocianato, el cual rápidamente reacciona con los grupos sulfhidrilos [Dinkova-Kostova et al., 2017]. Hu et al. [2011] indicaron que la Cys<sup>151</sup> es una de las cuatro cisteínas preferencialmente modificadas por SFN, causando la disrupción del complejo Keap1/Nrf2, inhibiendo la ubiquitinación y degradación proteosómica de Nrf2 [Yang et al., 2016]. Como se ha discutido a lo largo de este trabajo, una vez libre el Nrf2 se transloca al núcleo para activar genes regulados por ARE [Mukherjee et al., 2010; Bai et al., 2015]. La liberación de Nrf2 de su represor puede llevarse a cabo después de la fosforilación por MAPK [Yu et al., 2010] y PKC [Huang et al., 2002], algunas de las cuales han sido señaladas como blancos del SFN [Bai et al., 2015; Xin et al., 2018] (Figura 9b). Por ejemplo, Leoncini et al. [2011] demostraron que SFN activa tanto a Akt y a ERK1/2 confiriendo citoprotección contra el daño oxidante inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cardiomiocitos. Por otro

lado, se ha reportado que SFN activa a PI-3K [Yu et al., 2016], p38 [Keum et al., 2006] y JNK [Forster et al., 2014] en diferentes contextos experimentales.



**Figura 9 Inducción del Nrf2 por sulforafano. (a)** Reacción de la mirosinasa y la inter-conversión a sulforafano. **(b)** Activación de Nrf2 por sulforafano y el papel de las vías de señalización.

## II. Justificación de ambos modelos

Las afecciones a nivel cerebral y cardíaco se posicionan en la cima de la pirámide como las principales causas de muerte en el mundo. Sólo en México, el 50% y el 22% de las defunciones fueron a causa de enfermedades cardiovasculares (ECV) y cerebrales, respectivamente. De manera importante, 8 de cada 10 personas que fallecieron (por cualquiera de ambas causas) tenían 60 años o más. Es por ello que en este trabajo decidimos abordar el problema con dos aproximaciones experimentales muy diferentes, pero basadas en la regulación redox y la participación de Nrf2, las cuales dieron lugar a un artículo de investigación y dos artículos de revisión.

Por un lado, la enfermedad de Huntington es una patología de difícil diagnóstico y se ha determinado que las enfermedades del corazón son la segunda causa de muerte en estos pacientes. Por lo tanto, en este trabajo surge el interés de esclarecer si en ratas viejas con neurodegeneración co-existe la disfunción cardíaca asociada a la producción de ERO y de ser así, determinar si las células cardíacas son capaces de activar al factor de transcripción Nrf2 como mecanismo de protección luego del daño oxidante inducido por el ácido 3-nitropropiónico (3-NP).

En una segunda aproximación, para evaluar si la activación de este factor representa una oportunidad terapéutica para tratar enfermedades asociadas con el aumento en el estrés oxidante, utilizamos el modelo de daño por isquemia y reperfusión cardíaca *in vivo*, usando ratas sometidas a post-acondicionamiento isquémico (PostC) y tratadas con sulforafano (SFN), dos estrategias de protección que podrían converger en la activación de Nrf2 como posible mecanismo de cardioprotección.

La idea de usar dos modelos distintos, usando agentes que modifican el estado redox, es demostrar que la activación de Nrf2 es un mecanismo general de protección en el corazón.

### III. Hipótesis general de ambos modelos

El factor de transcripción Nrf2 es una de las principales proteínas involucradas en la respuesta antioxidante, por lo que, se espera que al activarlo mediante la administración de diferentes moléculas, confiera protección cardiaca ante diferentes estímulos que induzcan daño oxidante.

#### *Hipótesis particular*

1. El pre-acondicionamiento con tBHQ inducirá cardioprotección tanto a animales adultos como en viejos al activar al factor de transcripción Nrf2 luego del daño oxidante producido por 3-NP.
2. El SFN reducirá el daño cardiaco estimulando la respuesta antioxidante via la activación de Nrf2 en corazones sometidos a isquemia y reperfusión.

A partir de aquí, la tesis se dividirá en dos y se describirán los resultados obtenidos en cada uno de modelos experimentales de manera independiente, iniciando por el planteamiento de los objetivos y la descripción de la metodología utilizada en cada modelo.

## IV. Modelos estudiados

1. *Daño cardiaco en un modelo de la enfermedad tipo Huntington en ratas envejecidas: Papel de las especies reactivas de oxígeno*

## V. Objetivos

### *1.1.1. General*

Evaluar si la disfunción cardíaca co-existe con la neurodegeneración inducida por 3-NP y si el factor de transcripción Nrf2 podría ser inducido farmacológicamente por tBHQ en ratas viejas.

### *1.1.2 Particulares*

- a. Evaluar la función y morfología del corazón de ratas adultas y viejas en todos los grupos experimentales.
- b. Evaluar marcadores de daño por estrés oxidante en tejidos cardíacos de ratas adultas y viejas de los diferentes grupos experimentales.
- c. Evaluar el efecto del pre-acondicionamiento con tBHQ en la translocación y activación de Nrf2 en ratas adultas y viejas en todos los grupos experimentales.
- d. Correlacionar el contenido de enzimas antioxidantes con la activación de Nrf2 en ratas adultas y viejas de los grupos experimentales.

## VI. Material y métodos

Esta investigación se llevó a cabo conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (US-NIH, NIH publicación 85-23, 1985) y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. El trabajo experimental siguió las normas de la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (NOM.062-ZOO-1999) y para la eliminación de los residuos biológicos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

### 1.2.1 Animales

Para esta parte del trabajo se usaron ratas albino Wistar (*Rattus norvegicus*) hembras adultas (9 meses) y viejas (24 meses), proporcionadas por una colonia cerrada del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez y de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Se emplearon un total de 39 ratas adultas y 36 ratas viejas y se mantuvieron en cajas de acrílico (3 animales por caja) bajo condiciones estándar de temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) y ciclos (12 h/12 h) de luz-obscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta comercial (Rodent Chow, St. Louis, MO) y con agua *ad libitum*.

### 1.2.2 Reactivos

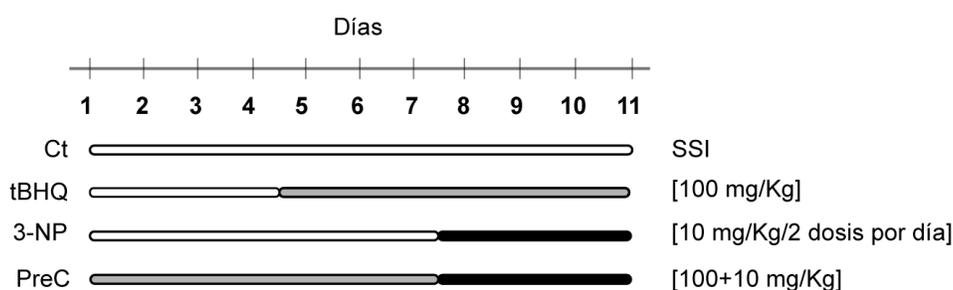
Los reactivos tert-butilhidroquinona (tBHQ), ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y otros químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (San Luis, MO). Los compuestos se disolvieron en solución salina isotónica (SSI) para su administración. El sistema de detección quimioluminiscente y el kit de Oxiblot™ se compraron de Millipore (Bedford, MA). Los kits para el ensayo de movilidad electroforética (EMSA) y la extracción de proteína nuclear fueron comprados de Thermo Scientific (Pierce Biotechnology, Rockford).

### 1.2.3 Anticuerpos

Todos los anticuerpos fueron obtenidos de fuentes comerciales y usados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Anti-Nrf2 (sc-722), anti-GST (sc-22755), anti- $\gamma$ -GCS (sc-22755), anti-GAPDH (sc-27724) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-HO-1 (#3391) de Bio-Vision (Milpitas, CA), anti-MMP-2 (#13405) de Millipore (Bedford, MA) y anti-Colagenasa-III (#26310) de GeneTex (San Antonio, TX). Anti-GAPDH (sc-47724) o anti-actina fueron usados como controles de carga para la fracción citosólica y Lamina-A (ab26300, Abcam, Cambridge, MA) para las fracciones nucleares.

### 1.2.4 Grupos experimentales

Las ratas adultas y viejas se distribuyeron al azar en 4 grupos experimentales (n=3-6 animales independientes) (Figura 10) como se describe a continuación: (1) *Grupo control*, ratas que recibieron únicamente SSI intraperitonealmente (i.p.) como vehículo durante 11 días; (2) *Grupo tBHQ*, ratas que recibieron SSI i.p. durante 4 días y luego tBHQ (100 mg/Kg/día) i.p. por 7 días; (3) *Grupo 3-NP*, ratas que recibieron SSI i.p. por 7 días y luego 3-NP (10 mg/Kg/2 dosis por día) i.p. por 4 días y (4) *Grupo pre-acondicionado (PreC)*, ratas tratadas con tBHQ i.p. por 7 días, seguido del tratamiento con 3-NP (10 mg/Kg/2 dosis por día) i.p. por 4 días. Este esquema de tratamiento para generar daño con 3-NP se asocia con una degeneración estriatal, genera síntomas de EH tal como el incremento de gliosis reactiva y un comportamiento motor hipoactivo. Tanto el esquema de pre-tratamiento con tBHQ como con 3-NP, se realizaron de acuerdo a nuestro trabajo previo del laboratorio [Silva-Palacios et al., 2017].



**Figura 10.** Esquema de tratamientos administrados a animales adultos y viejos. Ct: Grupo control; SSI: solución salina isotónica.

### 1.2.5 Evaluación de la función cardíaca por ecocardiografía

Las ratas de los diferentes grupos fueron anestesiadas con una dosis baja de pentobarbital (1.9 mg/100g, i.p.) para realizar el análisis ecocardiográfico usando un ecocardiógrafo Sonos 550 (Koninlijke Phillips Electronics, Eindhoven, The Netherlands) y un transductor de 12 MHz de acuerdo a nuestro reporte previo [Hernández-Reséndiz et al., 2013]. El eje largo y corto paraesternal fueron analizados por ecocardiografía en 2D en modo M, evaluando al menos 3 pulsos en cada rata. La cavidad y el espesor del LV fueron determinados para poder calcular la fracción de eyección usando la fórmula:  $\%FE = Y + [(100 - Y) \cdot 0.15]$ , donde  $Y = [LVEDD^2 - LVESD^2 / LVEDD^2] \cdot 100$  así como la fracción de acortamiento  $\%FA = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \cdot 100$ , donde LVEDD es la dimensión del LV al final de la diástole y LVESD es la dimensión del LV al final de la sístole [Stein et al., 2007]. Al final, se permitió que los animales se recuperaran por algunos días antes de su eutanización, para la extracción del tejido cardíaco.

### 1.2.6 Análisis histológico

Los animales se anestesiaron con pentobarbital (5mg/100g, i.p.) y la respuesta a la pérdida del dolor se evaluó determinando el reflejo del pedal. Los corazones y los pulmones fueron extraídos y pesados, para

realizar el cociente con respecto al peso corporal para el análisis de la función cardiaca. El tejido cardiaco se fijó en *p*-formaldehído al 4% por 48 horas, se embebió en parafina y se seccionó en un micrótopo de rotación Leica RM 2125RT (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Las secciones del tejido cardiaco (2  $\mu$ m de espesor) se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) o tricrómico de Masson. El LV de los tejidos se analizaron usando un Carl Zeiss Primo Star Image Analyzer con una cámara integrada Zeiss Axiocam ERc 5S (LLC, US).

### *1.2.7 Marcadores de daño por estrés oxidante*

*Proteínas.* Los grupos carbonilos se detectaron usando el Kit Oxiblot Protein Oxidation Detection (Millipore, Billerica, MA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La intensidad de las bandas fue digitalmente cuantificada usando el software Image Studio Lite (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska). *Lípidos.* El análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se usó para evaluar la lipoperoxidación en homogenados de corazón de acuerdo a Persky et al. [2000]. El aducto MDA • TBA en el sobrenadante se detectó a 532 nm en un Beckman DU-65 Spectrophotometer (Brea, CA). Las concentraciones de MDA se calcularon en función de una curva estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano y los resultados se expresaron en TBARS nmol/mg proteína. *Niveles de GSH reducido.* La determinación de los niveles de GSH se realizó de acuerdo a Buelna-Chontal et al. [2014]. Los cambios en la fluorescencia se midieron a una longitud de onda de 385 nm y 478 nm de excitación y emisión, respectivamente en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 54 (Waltham, MA) a 37°C. Los valores obtenidos se compararon con una curva estándar de GSH y los resultados se expresaron como  $\mu$ M GSH/mg proteína. La concentración de proteína se determinó de acuerdo a Lowry et al. [1951].

### *1.2.8 Aislamiento de proteínas de las fracciones citosólicas y nucleares*

El ventrículo izquierdo (100 mg) se obtuvo al final de cada protocolo experimental. El tejido se congeló y se maceró con nitrógeno líquido usando un mortero con pistilo. Posteriormente, los tejidos pulverizados se disolvieron en 1 ml de buffer de lisis RIPA frío (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato de sodio) y 10  $\mu$ l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1mM) [Hernández-Reséndiz et al., 2015] suplementados con inhibidor de proteasas (Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) y homogenizados usando un homogeneizador Dounce en frío. Los homogenados fueron centrifugados a  $11,000 \times g$  por 15 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -70°C para los análisis posteriores. Las fracciones citosólicas y nucleares se obtuvieron con el Kit NE-PER® (Thermo Scientific, Rockford, IL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y fueron almacenadas a -70°C. La concentración de proteína se determinó de acuerdo a Lowry et al. [1951].

### 1.2.9 Análisis de Western blot

Las proteínas (30-50  $\mu\text{g}$ ) de cada fracción fueron separadas en SDS-PAGE en geles de 10-15%, transferidas a membranas PVDF (Inmobilon®-P, Millipore, MA) e incubadas con anticuerpos primarios específicos contra Nrf2 (1:200), GST (1:200),  $\gamma$ -GCS (1:200), HO-1 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), MMP-2 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y Colágeno-III (1:1000). Las proteínas se visualizaron usando un sistema de detección quimioluminiscente (Millipore, MA). Cada membrana fue incubada con su respectivo control de carga (marcadores citosólicos y/o nucleares: GAPDH/Actina (1:1000) y Lamina-A (1:1000), respectivamente). Todas las imágenes se analizaron usando un software Image Studio Lite (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska).

### 1.2.10 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo EMSA se realizó de acuerdo a Buena-Chontal et al. [2014]. Brevemente, el oligonucleótido biotinilado que contiene la secuencia del elemento de respuesta antioxidante (ARE: GATCTTTTATGTC-CATGGTTT) (Accesolab, Ciudad de México) fue usado como el blanco del ADN. Proteínas nucleares (10  $\mu\text{g}$ ) se incubaron en un buffer de reacción de unión que contenía 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de poly (dI•dC), 0.05% Nonidet P-40, 2.5% glicerol, 10 mM EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05M KCl y 20 fmol de ARE marcado con Biotina (B-ARE) por 60 min a temperatura ambiente. El ensayo de competencia se realizó adicionando un exceso de ARE no marcado por 30 min, antes de la adición de B-ARE. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida nativo al 10% pre-corrido por 60 min en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE). Los complejos fueron separados a 100V y transferidos a una membrana de nylon cargada positivamente en TBE a 380 mA por 30 min. El ADN transferido se entrecruzó a la membrana y la detección quimioluminiscente se realizó usando un conjugado estable de estreptavidina-HRP. El análisis de la unión Nrf2-ADN se llevó a cabo usando el software Image Studio Lite (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska).

### 1.2.11 Análisis estadístico

Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de al menos 3 experimentos independientes por cada protocolo experimental en triplicado. Los niveles de significancia ( $p \leq 0.05$ ) se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc por comparaciones múltiples usando una prueba de Tukey (GraphPad Prism versión 6.0).

## VII. Resultados

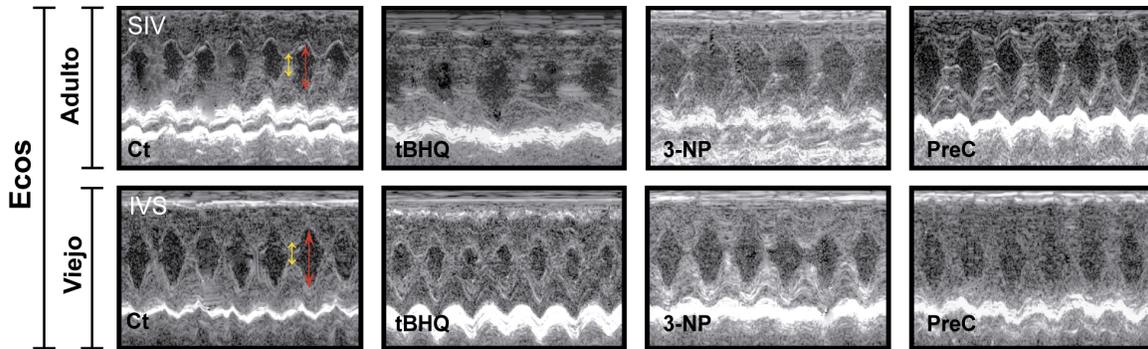
### 1.3.1 Función cardiaca y análisis estructural

Los ecocardiogramas representativos de ambos grupos de edad se muestran en la *Figura 11*. El peso del corazón, el peso corporal, la fracción de acortamiento y la frecuencia cardiaca incrementaron en los animales controles viejos ( $p < 0.01$ ) (*Tabla 1*) en comparación con los animales adultos controles; mientras que la relación del peso del pulmón/peso corporal y la dimensión del ventrículo izquierdo al final de la sístole (LVESD) disminuyó en animales viejos del grupo control ( $p < 0.01$ ) al compararse con los animales adultos sin ningún tratamiento. Los datos ecocardiográficos fueron similares en todos los grupos de animales adultos (*Tabla 1*). El tratamiento con 3-NP y tBHQ en animales viejos indujo una disminución del peso corporal, el peso del corazón y en el LVESD comparado con su propio grupo control ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). El espesor del septum interventricular y el peso del corazón incrementaron en el grupo PreC de animales adultos y viejos, pero ninguno de estos cambios se reflejó en la fracción de eyección, un indicador de función cardiaca. Nuestros datos indican cambios a nivel estructural en el corazón sin comprometer su función en los animales viejos.

### 1.3.2 Histología cardiaca

Puesto que existe la posibilidad de que las células tuvieran un umbral para la acumulación de daño antes de que se observe una alteración en la función del órgano, exploramos el efecto del 3-NP en ambos grupos de edad a nivel celular. El análisis morfológico de las células cardiacas se realizó con la tinción de H&E. Las secciones del corazón del grupo control adulto mostraron una arquitectura normal de los cardiomiocitos con núcleos colocados centralmente (*Figura 12A*), en tanto en el grupo control de animales viejos las células están alargadas (*Figura 12B*), en ambos grupos la organización de las fibras se preservó. Los corazones de los animales adultos o viejos suplementados con tBHQ no mostraron ningún cambio visible comparado con sus propios controles (*Figura 12C y D*); mientras que el tratamiento con 3-NP indujo una mayor desorganización de las fibras en corazones adultos (*Figura 12E*) que en los corazones de ratas viejas (*Figura 12F*). La estructura cardiaca en el grupo PreC de animales adultos se mantuvo (*Figura 12G*) y tampoco hubo cambios aparentes en los corazones viejos (*Figura 12H*). Por lo tanto, concluimos que la neurodegeneración y los efectos tóxicos directos inducidos por 3-NP en el miocardio de ratas viejas, no concurren con la disfunción cardiaca ni en ratas adultas ni viejas, mientras que el tratamiento con tBHQ no indujo cambios importantes en los animales viejos. Por otro lado, los principales componentes de la matriz extracelular, colágena y fibronectina, se analizaron con la tinción de tricrómico de Masson. Comparado con el grupo control adulto (*Figura 12I*), los animales viejos mostraron una fibrosis intersticial superior (*Figura 12J*). El tratamiento con tBHQ indujo un ligero incremento en la fibrosis en animales adultos (*Figura 12K*), la cual se exacerbó en el tejido cardiaco de los animales viejos (*Figura 12L*). También se observó fibrosis perivasculare en animales viejos tratados con 3-NP (*Figura 12M*). Inter-

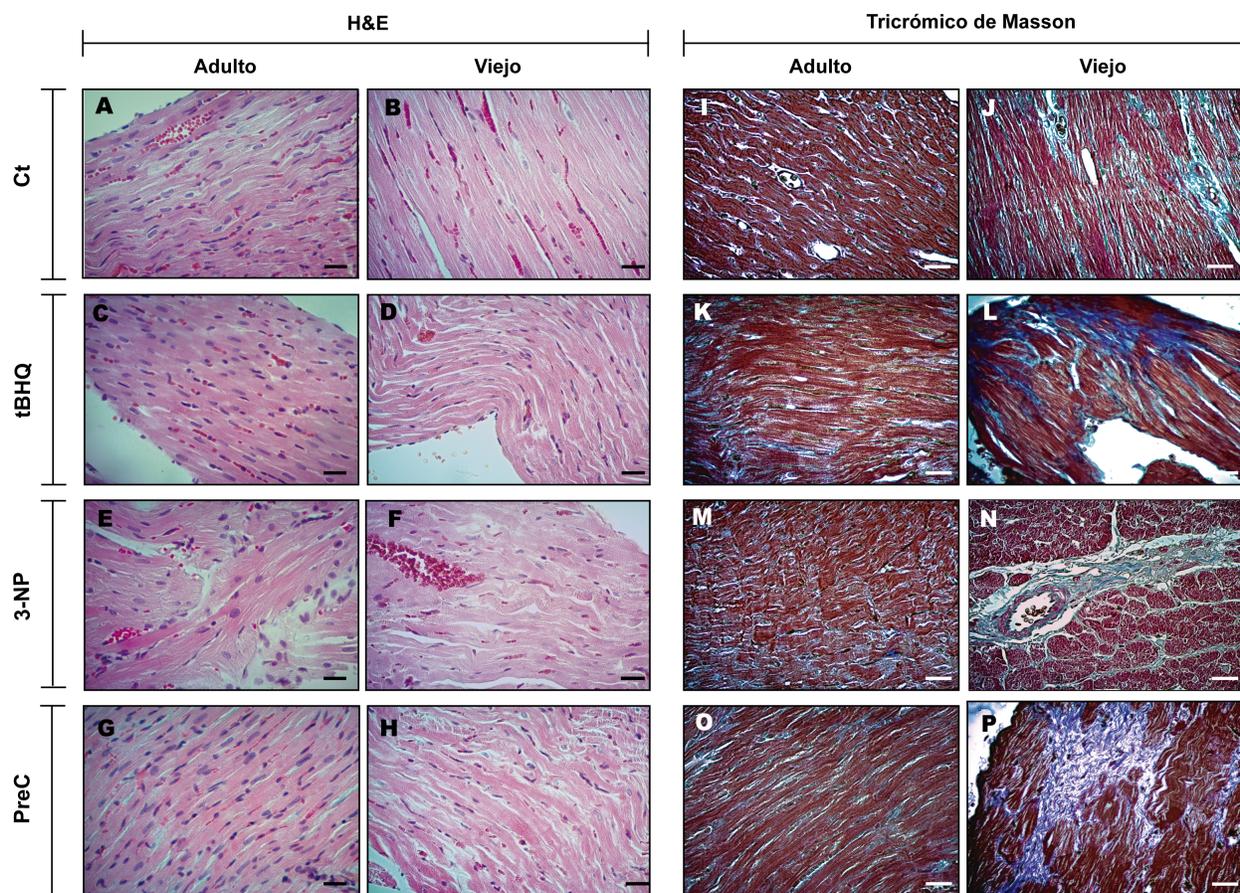
esantemente, el pre-tratamiento con tBHQ (grupo PreC) incrementó la fibrosis en animales viejos (*Figura 12P*), pero no en el grupo PreC adulto (*Figura 12O*) el cual mantuvo una apariencia similar a su propio control.



**Figura 11 Efecto del tratamiento con 3-NP en la función cardíaca de animales adultos y viejos.** Imágenes ecocardiográficas representativas (Ecos). SIV: septum interventricular, dimensión del LV al final de la diástole (LVEDD, flechas rojas) y sístole (LVESD, flechas amarillas).

Parámetro	Adultos				Viejos			
	Ct	tBHQ	3NP	PreC	Ct	tBHQ	3NP	PreC
Peso corporal (BW, g)	247 ± 8	260 ± 13	250 ± 9	242 ± 19	<b>385 ± 33</b>	305 ± 31 <sup>a</sup>	318 ± 26 <sup>a</sup>	341 ± 48
Peso del corazón (HW, g)	1 ± 0.2	1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1 ± 0.1	<b>2 ± 0.4</b>	1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
HW/BW (g/Kg)	4 ± 0.4	4 ± 0.3	3.7 ± 0.6	4.3 ± 0.4	4.4 ± 1.14	3.6 ± 0.4	3.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.7
Peso del pulmón (LW, g)	2 ± 0.1	2 ± 0.3	2 ± 0.3	2 ± 0.3	2.3 ± 0.8	2.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.4
LW/BW (g/Kg)	9 ± 1	8 ± 0.5	7 ± 1	8.4 ± 1.8	<b>6.5 ± 2.9</b>	7 ± 3.4	5.7 ± 1.0	5.9 ± 0.9
SIV (mm)	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
LVEDD (mm)	5.4 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.06	5.2 ± 0.5	4.5 ± 0.2	4.8 ± 0.4	5.2 ± 0.6
LVESD (mm)	3 ± 0.1	2.3 ± 0.5	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.2	<b>2.6 ± 0.6</b>	1.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.5
Fracción de eyección (FE, %)	86 ± 2	90 ± 6	86 ± 3	86 ± 3	86 ± 8	94 ± 4	91 ± 4	90 ± 6
Fracción de acortamiento (%)	48 ± 2	59 ± 2	49 ± 4	48 ± 3	<b>53 ± 10</b>	62 ± 11	56 ± 7	54 ± 8
Frecuencia cardíaca (lat/min)	142 ± 6	127 ± 10	136 ± 2	143 ± 16	<b>155 ± 22.8</b>	137 ± 4.3	131 ± 18	145 ± 10.7
Parámetros funcionales	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=3)	(n=6)	(n=3)	(n=3)	(n=3)

**Tabla 1 Parámetros estructurales y funcionales de animales adultos y viejos.** Los datos representan la media ± DE, los números en negro indican  $p < 0.01$  vs. Ct Adulto. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. su propio control.



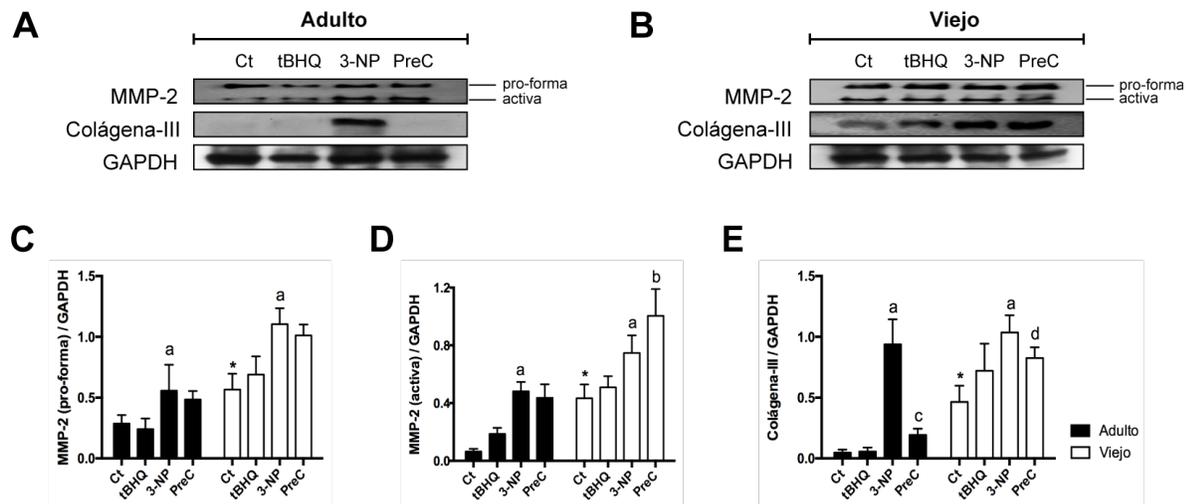
**Figura 12** Secciones del LV teñidas con H&E y tricrómico de Masson. Los cambios morfológicos del LV se analizaron con microscopía de luz (Barras = 40 $\times$ ) en animales adultos y viejos. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes por cada grupo.

### 1.3.3 Remodelación cardiaca

El daño y la pérdida de la matriz extracelular del miocardio (MEM) son características importantes de la remodelación cardiaca asociada con la edad. Por ello y como un marcador de estos cambios, se evaluó el contenido de la metaloproteinasa-2 (MMP-2) en su forma latente y activa (*Figura 13*) en todas las condiciones experimentales. Los niveles basales de MMP-2 activa fueron superiores ( $p < 0.001$ ) en los corazones de las ratas viejas controles (*Figura 12B*) que en las ratas adultas control (*Figura 12A*). La forma activa incrementó hasta un 50% ( $p < 0.001$ ) después del tratamiento con 3-NP únicamente en los corazones adultos, pero no disminuyó con el pre-acondicionamiento con tBHQ.

Ya que las alteraciones de colágena han sido relacionadas con cambios en la MEM, su contenido también se evaluó. Como se muestra en la *Figura 13A* y *B*, el contenido de colágena-III incrementó ( $p < 0.001$ ) en corazones viejos controles vs. los animales adultos controles, corroborando la activación de procesos de remodelación en el envejecimiento cardiaco. El tratamiento con 3-NP exacerbó hasta 10 veces el contenido de colágena-III en corazones adultos (*Figura 13E*,  $p < 0.001$ ) en tanto el pre-acondicionamiento con tBHQ lo disminuyó (*Figura 13A*,  $p < 0.001$ ). Estos resultados correlacionan con los cambios en la organi-

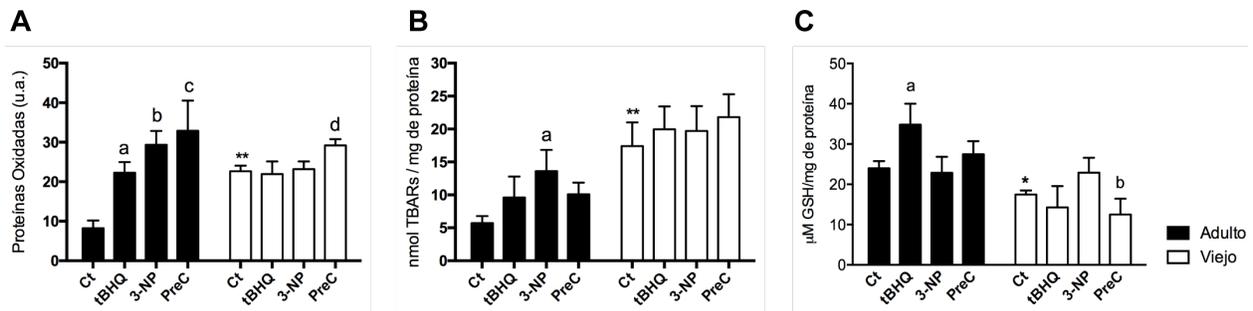
zación de las miofibrillas antes observados (*Figura 12E*). Por otro lado, el tratamiento con 3-NP incrementó los niveles de colágena-III en un 60% en los animales viejos comparado con su propio control, lo que se evitó parcialmente por el pre-acondicionamiento con tBHQ (*Figura 13B y E*). Estos resultados mostraron que la respuesta cardíaca al daño inducido por 3-NP y el pre-tratamiento con tBHQ difieren entre individuos adultos y viejos.



**Figura 13 Remodelación cardíaca en corazones de animales adultos y viejos.** Imágenes representativas del contenido de metaloproteínasa-2 (MMP-2) y colágena-III en animales (A) adultos y (B) viejos, normalizados con GAPDH. El análisis densitométrico se realizó después de la detección quimioluminiscente de MMP-2 (C, D) y colágena-III (E). Los resultados se obtuvieron de 3-4 experimentos independientes, los datos se expresan como la media  $\pm$  DE,  $^a p < 0.001$  vs. Ct,  $^b p < 0.001$ ,  $^c p < 0.001$ ,  $^d p < 0.05$  vs. 3-NP. Los asteriscos (\*) indican  $p < 0.001$  vs. control Adulto.

### 1.3.4 Marcadores de daño por estrés oxidante

Para correlacionar estos resultados con el daño oxidante, se midió la oxidación de proteínas y de lípidos, junto con los niveles de GSH. La *Figura 14A* muestra que el tratamiento con 3-NP aumenta la oxidación de proteínas ( $p < 0.01$ ) y de lípidos (*Figura 14B*,  $p < 0.001$ ) en los corazones de ratas adultas, sin ejercer ningún efecto en los corazones de animales viejos (*Figura 14A y B*). Por otro lado, el pre-acondicionamiento con tBHQ produjo una ligera disminución, aunque no significativa, en la lipoperoxidación de corazones adultos comparados con los animales viejos (*Figura 14B*). Sin embargo, en el grupo de mayor edad, el pre-acondicionamiento con tBHQ incrementó significativamente la oxidación de proteínas (*Figura 14A*). El contenido de GSH fue más bajo en el grupo control viejo que en corazones de animales adultos controles (*Figura 14C*,  $p < 0.05$ ); mientras que los corazones de los grupos tratados con 3-NP y PreC adultos mostraron valores de GSH similares a sus propios controles. El pre-acondicionamiento con tBHQ disminuyó el contenido de GSH en ratas viejas ( $p < 0.05$ ) comparado con el tratamiento con 3-NP. Estos resultados sugieren que el estrés oxidante sostenido y el daño que se genera durante el proceso de envejecimiento alcanzan un umbral máximo que no permite observar un efecto del 3-NP.



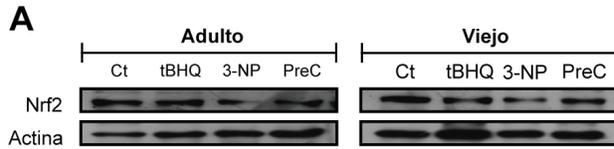
**Figura 14 Marcadores de daño por estrés oxidante.** (A) Evaluación de proteínas oxidadas en homogenado de tejido cardíaco. Para los animales adultos:  $^a p < 0.05$ ,  $^b p < 0.01$ ,  $^c p < 0.001$  vs. Ct. Para los animales viejos:  $^d p < 0.05$  vs. Ct. (B) TBARs en homogenado de tejido cardíaco,  $^a p < 0.001$  vs. Ct. (C) Contenido de GSH, para los animales adultos  $^a p < 0.05$  vs. Ct; para los animales viejos  $^b p < 0.05$  vs. 3-NP. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes para cada grupo.  $^* p < 0.01$ ,  $^{**} p < 0.001$  vs. Ct adulto.

### 1.3.5 Translocación nuclear de Nrf2

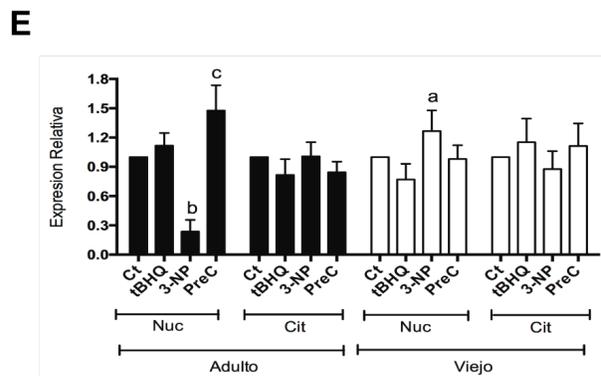
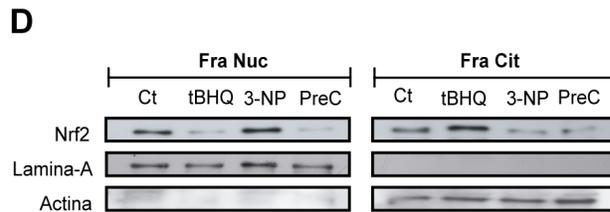
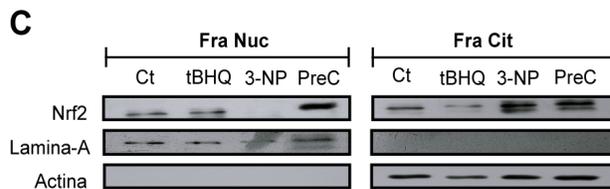
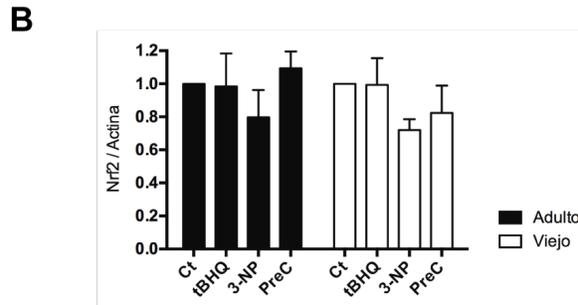
Para determinar si la respuesta a estrés oxidante estimulada por el tratamiento con 3-NP en los corazones de las ratas adultas y viejas está relacionada con cambios en la regulación de Nrf2, evaluamos su expresión y localización en el núcleo y citosol bajo los diferentes tratamientos. El análisis por Western blot indica que los niveles de Nrf2 en homogenados cardíacos son similares entre los animales adultos y viejos (Figura 15A y B). Sin embargo, el contenido de Nrf2 nuclear disminuyó significativamente ( $p < 0.001$ ) en el grupo adulto tratado con 3-NP comparado con los grupos control y tBHQ, en tanto se recuperó ( $p < 0.001$ ) con el PreC (Figura 15C y E). Por el contrario, el grupo de 3-NP aumentó los niveles de Nrf2 ( $p < 0.05$ ) en el núcleo de animales viejos (Figura 15D y E), lo que sugiere que, aunque la expresión de Nrf2 se mantiene durante el envejecimiento, la translocación es más eficiente dependiendo del estímulo y que el tBHQ ejerce una regulación diferente en los individuos adultos y viejos.

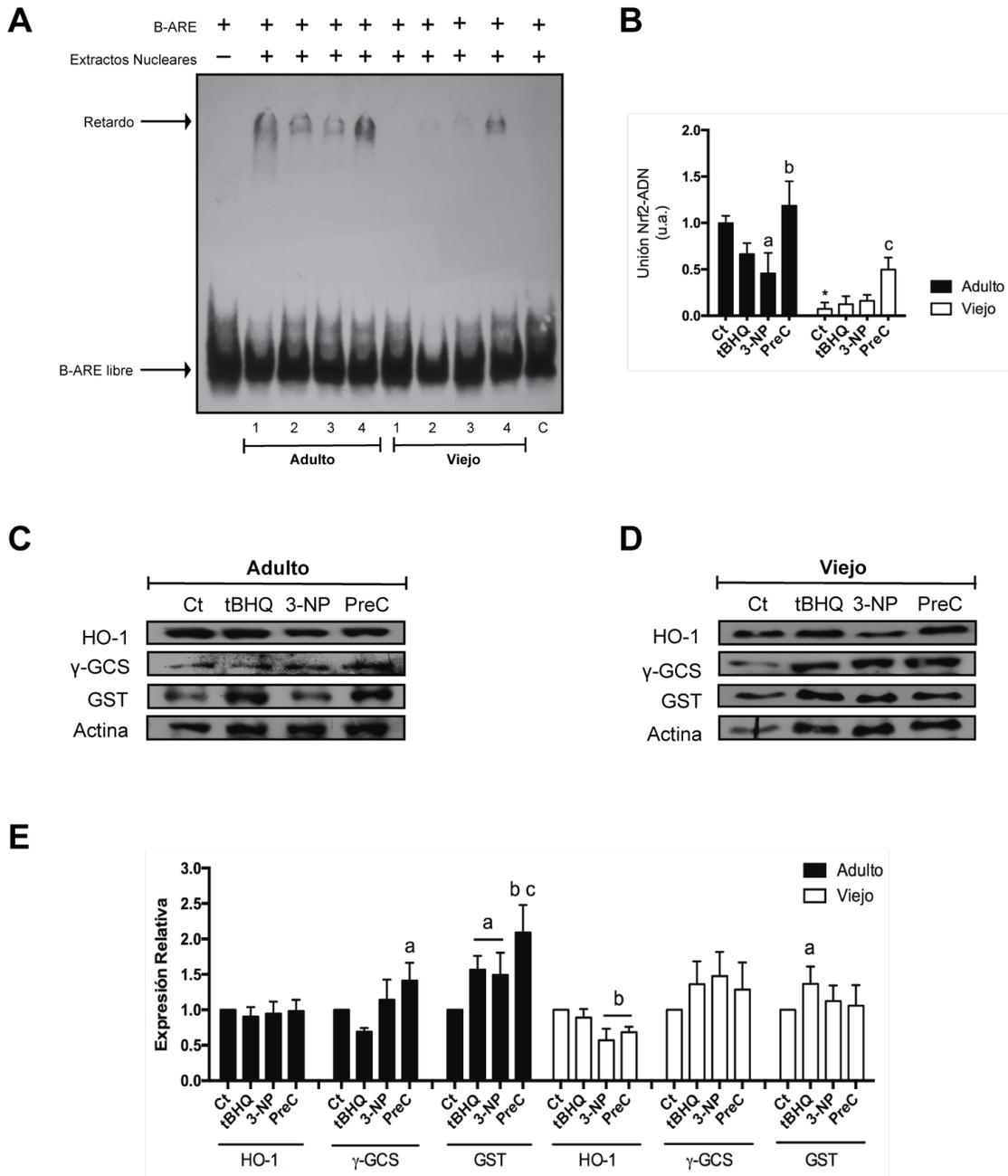
### 1.3.6 Eficiencia de la unión Nrf2-ARE en los corazones de animales adultos y viejos

Los extractos nucleares de los corazones de ambos grupos de edad se usaron para evaluar la unión de Nrf2 a ARE bajo las diferentes condiciones experimentales (Figura 16A). En animales adultos, el complejo Nrf2-ARE disminuyó en el grupo 3-NP ( $p < 0.05$ ) en comparación con los grupos control y tBHQ (Figura 16B), pero se recuperó en el grupo PreC ( $p < 0.01$ ) en relación con el aumento en la translocación nuclear de Nrf2 (Figura 12) y con el aumento en la expresión de  $\gamma$ -GCS ( $p < 0.05$ ) y GST ( $p < 0.001$ ) (Figura 16). Por el contrario, la unión de Nrf2 a su secuencia consenso disminuyó en los corazones de todos los grupos de ratas viejas, siendo incluso más bajo que en el grupo control adulto (Figura 16B). Por lo tanto, la translocación de Nrf2 en ratas viejas aparentemente no está comprometida (Figura 15D y E), pero, aun así, el factor de transcripción no se une eficientemente a su secuencia complementaria (Figura 16A), lo que evita la expresión de enzimas blanco de Nrf2 (Figura 16D).



**Figura 15** Contenido de Nrf2 en homogenado total, citosol y núcleo de corazones de animales adultos y viejos. Imágenes representativas del inmunoblot (A) y análisis densitométrico (B) del contenido de Nrf2 en homogenado total. Los niveles de Nrf2 se evaluaron en la fracción nuclear (Fra Nuc) y citosólica (Fra Cit) de animales adultos (C) y viejos (D). (E) Análisis densitométrico. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3-4 experimentos independientes de cada grupo. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$  vs. 3-NP.





**Figura 16 Activación de Nrf2 y respuesta antioxidante en animales adultos y viejos.** (A) Autorradiografía representativa del ensayo de movilidad electroforética de corazones adultos y viejos. Las líneas representan los grupos 1) Control, 2) tBHQ, 3) 3-NP y 4) PreC. (B) Análisis de la unión Nrf2-ADN obtenido por densitometría. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3-4 experimentos independientes en cada grupo. Para los animales adultos:  $a p < 0.05$  vs. Ct,  $b p < 0.01$  vs. 3-NP y  $c p < 0.001$  vs. 3-NP para los animales viejos.  $* p < 0.001$  vs. Ct Adulto. El contenido de enzimas antioxidantes en animales (C) adultos y (D) viejos. (E) Análisis densitométrico de enzimas antioxidantes. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3-4 experimentos independientes en cada grupo.  $a p < 0.05$ ,  $b p < 0.001$  vs. Ct,  $c p < 0.01$  vs. 3-NP.

## VIII. Discusión

Aunque la Enfermedad de Huntington (EH) está categorizada primariamente como una enfermedad neurológica, se ha propuesto que puede ser un desorden sistémico [Sassone et al., 2009; van der Burg et al., 2009] debido a que numerosos órganos periféricos y tejidos se afectan en estos pacientes [Phan et al., 2009; Mielcarek, 2015]. Incluso, los mecanismos moleculares relacionados a la progresión del Huntington observados en el cerebro, también se aprecian en otros órganos. A este respecto, la cardiomiopatía dilatada ha sido observada en pacientes con EH tanto en etapas tempranas como tardías de la degeneración neuronal [Piotrowska et al., 2017]. Además, la acumulación de metabolitos de adenina nucleótidos en el suero de estos pacientes se ha correlacionado con la disfunción cardíaca y el metabolismo alterado de nucleótidos en ratones con EH sintomáticos [Toczek et al., 2016a; Toczek et al., 2016b]. Otros estudios han asociado la patofisiología de la enfermedad con un incremento del estrés oxidante [Gu et al., 1996; Foguem & Kamsu-Foguem, 2016]. El aumento en la peroxidación de lípidos y los bajo niveles de GSH en el plasma de pacientes con EH han sido reportados como marcadores de confianza en la progresión de esta enfermedad [Stoy et al., 2005; Klepac et al., 2007]. Así mismo, se han usado herramientas terapéuticas basadas en antioxidantes tanto *in vitro*, en modelos transgénicos o tóxicos de la EH, así como en pacientes con la patología [Johri & Beal, 2012]. Por ejemplo, la N-acetil-L-cisteína disminuye la producción de ERO en células que expresan poliQ preservando su viabilidad [Vidoni et al., 2016].

Por otro lado, la administración de la neurotoxina mitocondrial 3-NP mimetiza muchas de las características patológicas en la EH. Induce lesiones en el caudado-putamen, incrementa el EO llevando a pérdida neuronal y gliosis reactiva en modelos animales tales como ratas [Beal et al., 1993] y primates [Brouillet et al., 1999; Lee & Chang, 2004]. El uso del 3-NP como un modelo farmacológico de la EH en animales tiene varias ventajas, reproduce la patofisiología observada en pacientes [Mehan et al., 2017], cruza la barrera hematoencefálica rápidamente al ser administrado sistémicamente [Stavrovskaya et al., 2016] y su principal acción ha sido relacionada con la disfunción mitocondrial, en particular con la inhibición del CII y la generación de ERO [Liot et al., 2009].

Estudios recientes en roedores jóvenes y adultos muestran que el tratamiento agudo con 3-NP promueve cambios morfológicos cardíacos, caracterizados por desorganización de sarcómeros y fibrosis [Gabrielson et al., 2001], disrupción de las bandas M [Hernández-Echeagaray et al., 2011], junto con incremento en la vasodilatación [Castillo et al., 1994] y bradicardia [Hong et al., 1990]. Aquí, reportamos que el tratamiento con 3-NP induce desorganización de las miofibrillas únicamente en los corazones adultos (*Figura 12*). Interesantemente, la función cardíaca se preservó en ambos grupos de edad (*Tabla 1*). Las discrepancias entre el daño observado en los estudios anteriores y el nuestro puede ser debido tanto a dosis más altas de 3-NP usadas previamente (75-100 mg/Kg) así como a la cepa de los animales. Por ejemplo, Gabrielson et al. (2001) indicaron que la cepa de ratón 129SVEMS es mucho más sensible al 3-NP, con una tasa de sobrevivencia del 20% *vs.* las cepas C57BL/6 y BALB/c. Sin embargo, es importante resaltar que, en nues-

tro modelo, los animales desarrollaron características neurológicas de EH relacionadas a la última etapa de la enfermedad [Silva-Palacios et al., 2017]. A nivel celular, el tratamiento con 3-NP incrementó el estrés oxidante en el corazón de ratas adultas (*Figura 14*), aunque no se reflejó en la función cardiaca. Interesantemente, dicho daño no fue observado en los individuos viejos (*Figura 14*), en quienes sólo cambios estructurales se apreciaron. En este sentido, nuestros resultados sugieren una mejor adaptación genética o que una respuesta hormética podría haberse establecido en los corazones de animales viejos, quienes están bajo un estrés sub-crónico a lo largo de la vida. El EO sostenido y la respuesta antioxidante podrían haber alcanzado un umbral máximo, que no puede ser superado por la acción del 3-NP (*Figura 14*). En años recientes, la **hormesis** ha ganado especial atención durante el proceso de envejecimiento [Luna-López et al., 2014] y se ha definido como “*un proceso en el cual la exposición a dosis bajas de un agente químico o factor ambiental (que daña a dosis superiores) induce un efecto benéfico adaptativo sobre la célula u organismo*” [Calabrese, 2008; Mattson, 2008; Hoffman, 2009]. Bajo ciertas circunstancias, niveles bajos de ERO (capaces de modificar el estado redox) pueden inducir una respuesta hormética activando la respuesta de sobrevivencia y antioxidante, que puede resultar benéfica a largo plazo [Luna-López et al., 2010; Pan et al., 2011], además de ser resultado de diversos tipos y grados de exposición al estrés, a la etapa celular en la que se experimentó el ambiente estresante o debido a la duración de la exposición del estresor [Constantini et al., 2014].

Recientemente, Meng et al. [2017] propusieron un concepto llamado *capacidad de respuesta a estrés redox (RRC)* para describir la capacidad que las células tienen para responder al estrés oxidante; específicamente generando una respuesta dinámica y mantener la homeostasis redox celular. El estrés oxidante es considerado la principal característica durante el proceso natural del envejecimiento y un mecanismo unificador de patologías relacionadas a la edad [Silva-Palacios et al., 2016]; sin embargo, algunos investigadores han encontrado que los oxidantes podrían tener efectos benéficos al regular la esperanza de vida [Rodríguez et al., 2011] o al menos, evitar que el incremento de las ERO no acelere el proceso de envejecimiento [van Remmen et al., 2003]. También se ha sugerido que el efecto del estrés oxidante en el envejecimiento depende del ambiente específico o de un estímulo particular [Salmon et al. 2010] y que bajo condiciones específicas la transcripción de genes antioxidantes puede ser fuertemente regulada. Nrf2 ha sido reconocido como el regulador maestro de la respuesta antioxidante y su pérdida o desregulación está asociada con varias patologías y en el envejecimiento [Kumar et al., 2016]. Datos controversiales sobre los mecanismos que conducen a la disfunción de Nrf2 en organismos viejos, incluyen la inactivación del factor en el citosol, la falla en su translocación nuclear o la disfunción en los mecanismos de expresión de sus genes blanco [Silva-Palacios et al., 2016, 2018]. En este sentido, un estudio reciente reportó que la translocación de Nrf2 hacia el núcleo está alterada en pacientes viejos [Gounder et al., 2012]. Otros reportes indican que los niveles nucleares de Nrf2 en ratas viejas sujetas a ejercicio moderado alcanzan valores comparables a aquellos observados en ratas jóvenes [Done et al., 2016] y que la administración de  $\alpha$ -ácido lipoico a ratas viejas activa la translocación nuclear de Nrf2 [Suh et al., 2004]. Nuestros resultados su-

man evidencia a la propuesta de que la activación de la ruta Nrf2 podría permanecer intacta en animales viejos, al no encontrar diferencias entre los niveles nucleares de Nrf2 entre ratas adultas o viejas (*Figura 15*). Sin embargo, la unión de Nrf2 a su secuencia ARE fue mayor tras el pre-acondicionamiento con tBHQ respecto a su propio control, sin cambios aparentes en el contenido de sus enzimas antioxidantes (*Figura 16*). Además, la respuesta hormética observada en las ratas viejas podría encajar en el concepto RRC recientemente descrito [Meng et al., 2017]. Nuestros hallazgos resaltan la prioridad de estudiar los activadores de Nrf2 como una terapia confiable para tratar enfermedades relacionadas con la edad y hace obligatorio encontrar los enlaces faltantes en la señalización y regulación de Nrf2 durante esta etapa de la vida.

## IX. Modelos estudiados

2. *Daño por isquemia y reperfusión: Efecto del sulforafano en la activación del Nrf2*

# X. Objetivos

## 2.1.1 General

Comparar la eficacia del sulforafano (SFN) y la maniobra mecánica del post-acondicionamiento (PostC) en cuanto a la inducción de la vía de señalización de Nrf2 en un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión.

## 2.1.2 Particulares

- a. Evaluar la función y morfología del tejido cardiaco de animales sometidos a PostC y SFN.
- b. Asociar el papel protector de ambas estrategias con la disminución del daño por estrés oxidante y la inflamación.
- c. Determinar la fosforilación de distintas cinasas (ERK1/2, GSK-3 $\beta$ , PI-3K y PKC) y su relación con la inducción de Nrf2 en animales post-acondicionados y/o tratados con SFN.

# XI. Materiales y métodos

Esta investigación se llevó a cabo conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (US-NIH, NIH publication 85-23, 1985) y aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. El trabajo experimental ha seguido las normas de la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para la eliminación de los residuos biológicos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

## 2.2.1 Animales

En este trabajo se usaron ratas albino Wistar (*Rattus norvegicus*) hembras adultas de 9-10 meses de edad (300-320 g) proporcionadas por una colonia cerrada en el Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. Se emplearon un aproximado de 90 ratas, mantenidas en cajas de acrílico (3 animales por caja) bajo condiciones estándar de temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y ciclos (12 h/12 h) de luz-obscuridad. Las ratas fueron alimentadas con una dieta comercial (Rodent Chow, St. Louis, MO) y con agua *ad libitum*.

## 2.2.2 Reactivos y anticuerpos

El sulforafano (SFN) y otros químicos fueron grado reactivo o superior y se adquirieron de Sigma-Aldrich (San Luis, MO). El sistema de detección quimioluminiscente y el kit de Detección de oxidación de proteínas (Oxyblot™) se obtuvieron de Millipore (Bedford, MA). Mientras que el kit de extracción de proteínas nucleares se adquirió de Thermo Scientific (Rockford, USA). Los anticuerpos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: Anti-Nrf2 (sc-722), anti-NQO1 (sc-376023), anti-p65 (sc-8008) y anti-Nitrotirosina (sc-32757) se compraron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-LC3 (NB100-2220) y anti-p62 (NBP1-48320) de Novus Biologicals (Southpark, CO). Anti-fosfo-Nrf2 (ab76026), anti-fosfo-PKC (ab59411), anti-fosfo-PI-3K (ab182651) y anti-PI-3K (ab86714) de Abcam (Cambridge, MA). Anti-fosfo-ERK1/2 (#4376), anti-ERK1/2 (#9102), anti-fosfo-GSK-3 $\beta$  (#5558), anti-GSK-3 $\beta$  (#5676) de Cell Signaling (Danvers, MA) y HO-1 (#3391) de BioVision (Milpitas, CA). Anti-GAPDH (sc-47724, Santa Cruz Biotechnology) o anti-actina (no comercial) fueron usados como controles de carga en homogenados y fracciones citosólicas, mientras anti-Lamina A (ab26300, Abcam) se usó para normalizar las fracciones nucleares.

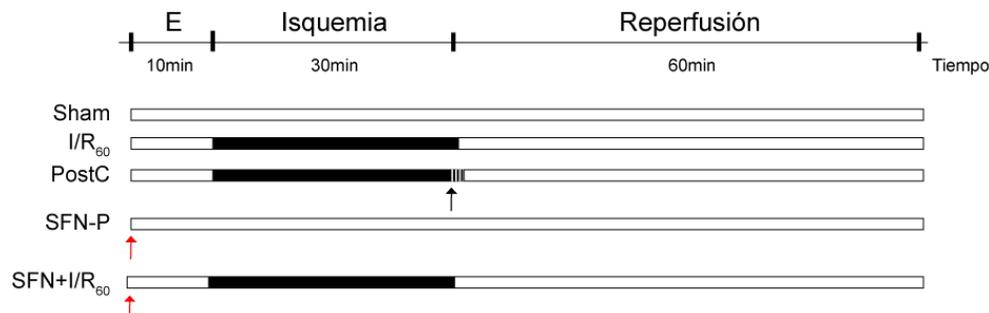
## 2.2.3 Experimentos *in vivo*

Las ratas se anestesiaron con 25mg/100g con pentobarbital de sodio y la falta de respuesta al dolor se evaluó determinando el reflejo del pedal. Se hizo una incisión en la línea media a lo largo del cuello seguido por una traqueotomía. Los animales fueron mecánicamente ventilados con un flujo bajo de oxígeno usan-

do un ventilador para especies pequeñas (Harvard Apparatus, Holliston, MA) en una tasa de 70 respiraciones/min. Después de la toracotomía izquierda y la exposición del corazón, los parámetros hemodinámicos se evaluaron con un catéter presión-volumen (SPR-869, Millar Instruments, Houston, TX) insertado en el ventrículo izquierdo. Los electrocardiogramas se registraron con el Animal Bio Amp (ADInstruments, Spechbach, Germany) usando electrodos en las extremidades. Una vez que los registros se estabilizaron, una sutura de nylon 6-0 se colocó alrededor de la arteria coronaria izquierda proximal y los extremos se pasaron a través de un pequeño tubo de plástico para formar una trampa, que se jaló para ocluir la arteria. La isquemia miocárdica visualmente se confirmó después de la cianosis y se mantuvo por 30 min, después la trampa se liberó y el corazón se reperfundió por 60 min. La frecuencia cardiaca, la presión del ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVEDP) y la sístole (LVESP) así como la tasa de cambio máxima del incremento y caída de la presión del ventrículo izquierdo ( $\pm dP/dt$ ) fueron continuamente registrados durante el procedimiento. La adquisición de datos y el análisis se llevaron a cabo con los softwares MPVS Ultra Foundation System y LabChart Pro de ADInstruments (Spechbach, Germany).

#### 2.2.4 Grupos experimentales

Los animales se separaron al azar en 5 grupos ( $n= 3-5$  animales independientes) (Figura 17): (1) *Grupo Sham*, animales que recibieron un procedimiento quirúrgico simulado, excepto que la arteria no se ligó; (2) *Grupo isquémico-reperfundido (I/R<sub>60</sub>)*, ratas sujetas a 30 min de isquemia y 60 min de reperfusión; (3) *Grupo post-acondicionado (PostC)*, ratas expuestas a restauración intermitente de suministro sanguíneo en tres ciclos de reperfusión-reoclusión (10 seg cada uno) después de la isquemia y la reperfusión prolongada; (4) *Grupo con SFN (SFN-P)*, animales que recibieron una inyección en la cavidad del LV con 500  $\mu\text{g/Kg}$  de SFN sin la maniobra y (5) *Ratas pre-tratadas con SFN* después de la inserción del catéter y posteriormente sometidas a isquemia y reperfusión (SFN+I/R<sub>60</sub>). Al final de los protocolos, aproximadamente 2 ml de sangre del seno coronario se colectó y se almacenó el ventrículo izquierdo a  $-70^{\circ}\text{C}$  para los experimentos posteriores.



**Figura 17 Grupos experimentales.** Las flechas negras indican la aplicación del PostC, mientras que las flechas rojas la administración de SFN. E, estabilización.

### *2.2.5 Medición del tamaño del infarto y examinación cardiaca*

El área infartada se evaluó de acuerdo a Hernández-Reséndiz et al. [2015]. Los corazones se lavaron en buffer frío (220 mM sacarosa, 10 mM HEPES, pH 7.3), se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 min y se realizaron 4 cortes paralelos a lo largo del surco auriculoventricular. La necrosis miocárdica se observó después de incubar los cortes con 1% de cloruro de trifeniltetrazolio durante 25 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . El área no teñida (tamaño del infarto) se cuantificó con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) y se comparó con el área de riesgo. Otros tejidos cardíacos se fijaron en 4% de *p*-formaldehído por 48 h, embebidos en parafina y serialmente seccionados en un micrótopo de rotación Leica RM 2125RT (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Las secciones cardíacas (2  $\mu\text{m}$  de espesor) se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y los ventrículos izquierdos se analizaron usando un Carl Zeiss Primo Star Image Analyzer con una cámara integrada Zeiss AxioCam ERc 5S (LLC, US).

### *2.2.6 Medición de lactato deshidrogenasa en suero*

Al final de los protocolos, aproximadamente 2 ml de sangre se colectaron de la pared del ventrículo izquierdo. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a  $1300 \times g$  por 10 min para obtener el suero y medir la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, U/L) usando el kit ELiTech Clinical Systems (LDH-L, France) a 340 nm en un lector de placas multimodal Synergy (BioTek, Winooski, VT).

### *2.2.7 Obtención de proteínas de nucleares y citosólicas*

Los tejidos cardíacos almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  se pulverizaron con un pistilo previamente enfriado en un mortero congelado y se homogeneizaron en buffer RIPA frío que contenía 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato de sodio y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo suplementado con inhibidor de proteasas (Complete<sup>TM</sup>, Roche). Los homogenados se centrifugaron a  $11,000 \times g$  por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y los sobrenadantes se recuperaron. Las fracciones nucleares y citosólicas se obtuvieron con el kit NE-PER<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Rockford, IL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La concentración de proteína se determinó de acuerdo a Lowry et al. [1951].

### *2.2.8 Marcadores de daño por estrés oxidante*

Los grupos carbonilos se detectaron usando el kit Oxyblot Protein Oxidation Detection Oxyblot<sup>TM</sup> (Millipore, Billerica, MA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las proteínas modificadas se detectaron con un sistema de detección quimioluminiscente (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las bandas se analizaron por densitometría con el Software Image Studio Lite (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska). Para evaluar la peroxidación de lípidos, los niveles de MDA se midieron con el ensayo de TBARS como previamente se describió [Silva-Palacios et al., 2017]. Los niveles de GSH se evaluaron fluoromé-

tricamente de acuerdo a Galván-Arzate et al. [2005]. Brevemente, las muestras del ventrículo izquierdo se homogeneizaron en un buffer fosfato-EDTA, pH 8.0 y se centrifugaron a  $3000 \times g$  por 15 min. Los sobrenadantes se recuperaron y alícuotas de 100  $\mu$ l se derivatizaron con 100  $\mu$ l de *o*-ftalaldehído (OPA, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l) en un volumen final de 2 ml durante 20 min a temperatura ambiente. La señal fluorescente se midió a 350 nm y 420 nm, de excitación y emisión, respectivamente en un LS50B Luminiscence Spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA). Muestras gemelas de 500  $\mu$ l se usaron para evaluar el GSSG, las alícuotas se incubaron por 30 min con 200  $\mu$ l de 40 mM de *N*-etilmaleimida para alquilar y estabilizar el grupo tiol libre del glutatión y prevenir su reacción con OPA. Entonces, las muestras se mezclaron con 4.3 ml de 0.1 N de NaOH, para favorecer la reacción de OPA con GSSG que se redujo a GSH a pH 12 [Hissin & Hilf, 1976]. Los resultados se normalizaron por mg de proteína. Por último, la nitración de tirosina fue medido por inmunoblot usando un anticuerpo anti-nitrotirosina para detectar estrés nitrosante. La intensidad de las bandas fue digitalmente cuantificada usando Image Studio Lite Software (Li-Cor Biosciences).

#### *2.2.9 Ensayo de la actividad de la NADP(H)quinonaoxidoreductasa-1 (NQO1)*

La actividad de la enzima, se cuantificó midiendo la reducción del 2,6- diclorofenilindofenol a 600 nm por 3 min en un lector de placas Synergy (BioTek, Winooski, VT) en presencia y ausencia de dicumarol, un inhibidor específico de NQO1 [Benson et al., 1980; Wilkinson et al., 1998]. La actividad de NQO1 se calculó como la disminución en la absorbencia por minuto por miligramo de proteína total de la muestra.

#### *2.2.10 Determinación de citocinas pro-inflamatorias*

Al final del experimento, el suero de la pared del ventrículo izquierdo se obtuvo para estimar la cantidad liberada de las IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , de acuerdo a Pavón et al. [2009]. Los valores de estas citocinas se midieron usando un ensayo de ELISA (PeproTech, Jersey City, NJ) que se realizó de acuerdo al fabricante, los resultados se normalizaron por miligramo de proteína.

#### *2.2.11 Análisis por inmunoblot*

Proteínas (30-50  $\mu$ g) de cada muestra se diluyeron 1:1 con buffer Laemmli (Sigma) y desnaturalizaron hirviéndolas por 3 min. Las membranas fueron analizadas por inmunoblot con anti-fosfo-Nrf2 (1:1000), anti-Nrf2 (1:200), anti-fosfo-PKC (1:1000), anti-fosfo-PI-3K (1:1000), anti-PI-3K (1:1000), anti-fosfo-ERK1/2 (1:1000), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-fosfo-GSK-3 $\beta$  (1:1000), anti-GSK-3 $\beta$  (1:1000), anti-NQO1 (1:500), anti-HO-1 (0.5  $\mu$ g/ml) y anti-Nitrotirosina (1:200). El cociente entre la proteína fosforilada y total se obtuvo en la misma membrana en todos los experimentos. Se realizó una normalización utilizando anti-actina (1:1000) o anti-GAPDH (1:1000) como control de carga para las proteínas citosólicas y anti-Lamina A (1:1000) para la fracción nuclear. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el software Image Studio Lite (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB).

### *2.2.12 Inmunotinción cardiaca*

Para prevenir la degradación del antígeno, las secciones cardíacas se almacenaron a 4°C previos al ensayo. Las secciones del tejido cardíaco se desparafinaron e hirvieron en presencia de 3% de citrato de sodio con 0.2% de Tritón X-100 para desenmascarar los sitios antigénicos. La actividad de peroxidasa endógena se neutralizó con 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las uniones no específicas se redujeron usando una solución de albúmina sérica bovina al 1%. Las secciones se incubaron con anti-Nrf2 (1:50), anti-fosfo-Nrf2 (1:200), anti-LC3 (1:200), anti-p62 (1:200) y anti-p65 (1:50) diluidos en PBS toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a HRP (DAKO kit, Dakocytomation). Finalmente, todas las secciones se incubaron con diaminobencidina y se co-tiñeron con hematoxilina. Tres secciones se obtuvieron del ventrículo izquierdo de cada corazón y diferentes campos se analizaron con un analizador de imágenes Carl Zeiss Primo Star Image Analyzer con una cámara integrada Zeiss Axiocam ERc 5S (LLC, US).

### *2.2.13 Análisis estadístico*

Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de al menos 5 experimentos independientes en cada grupo por duplicado. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido de una prueba por comparaciones múltiples Tukey, usando el software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA) con un valor de  $p \leq 0.05$  que se consideró como estadísticamente significativo.

## XII. Resultados

### 2.3.1 Función y estructura cardiaca

Durante la isquemia y al final de la reperfusión, se determinó una reducción ( $p \leq 0.05$ ) en la frecuencia cardiaca y la presión del ventrículo izquierdo al final de la sístole (LVESP) en el grupo I/R<sub>60</sub>, estos parámetros aumentaron (junto con la tasa de contractilidad, +dP/dt) después de la aplicación del post-acondicionamiento (PostC,  $p \leq 0.05$ ). Mientras que, el pre-tratamiento con SFN (SFN+I/R<sub>60</sub>) mejoró la función cardiaca incluso a niveles superiores que en el grupo Sham (Tabla 2). En línea con lo anterior, observamos hasta un 20% menos del tamaño del infarto (Figura 18C) y la disminución de la actividad de la enzima LDH ( $p \leq 0.05$ ) comparado con el grupo I/R<sub>60</sub> (600 U/L vs. 900 U/L) (Figura 18D). En las secciones cardiacas del grupo Sham, se mostraron fibras organizadas y arquitectura normal de los cardiomiocitos con núcleos colocados centralmente (Figura 18B). Mientras, que el grupo con isquemia-reperfusión presentó desorganización de las miofibrillas, que se preservó tanto en el grupo PostC como en el grupo SFN+I/R<sub>60</sub>. Este grupo también mantuvo la función cardiaca (Tabla 2), la arquitectura celular (Figura 18B), disminución en el tamaño del infarto (Figura 18A) y en la actividad de la LDH (Figura 18D). Aunque no hubo cambios significativos entre el tratamiento con PostC y SFN+I/R<sub>60</sub>, la recuperación de los parámetros hemodinámicos fue superior en el último grupo, lo que sugiere que el tratamiento con SFN podría ser el más efectivo para mantener la función y estructura del corazón.

### 2.3.2 Marcadores de daño por estrés oxidante y nitrosante

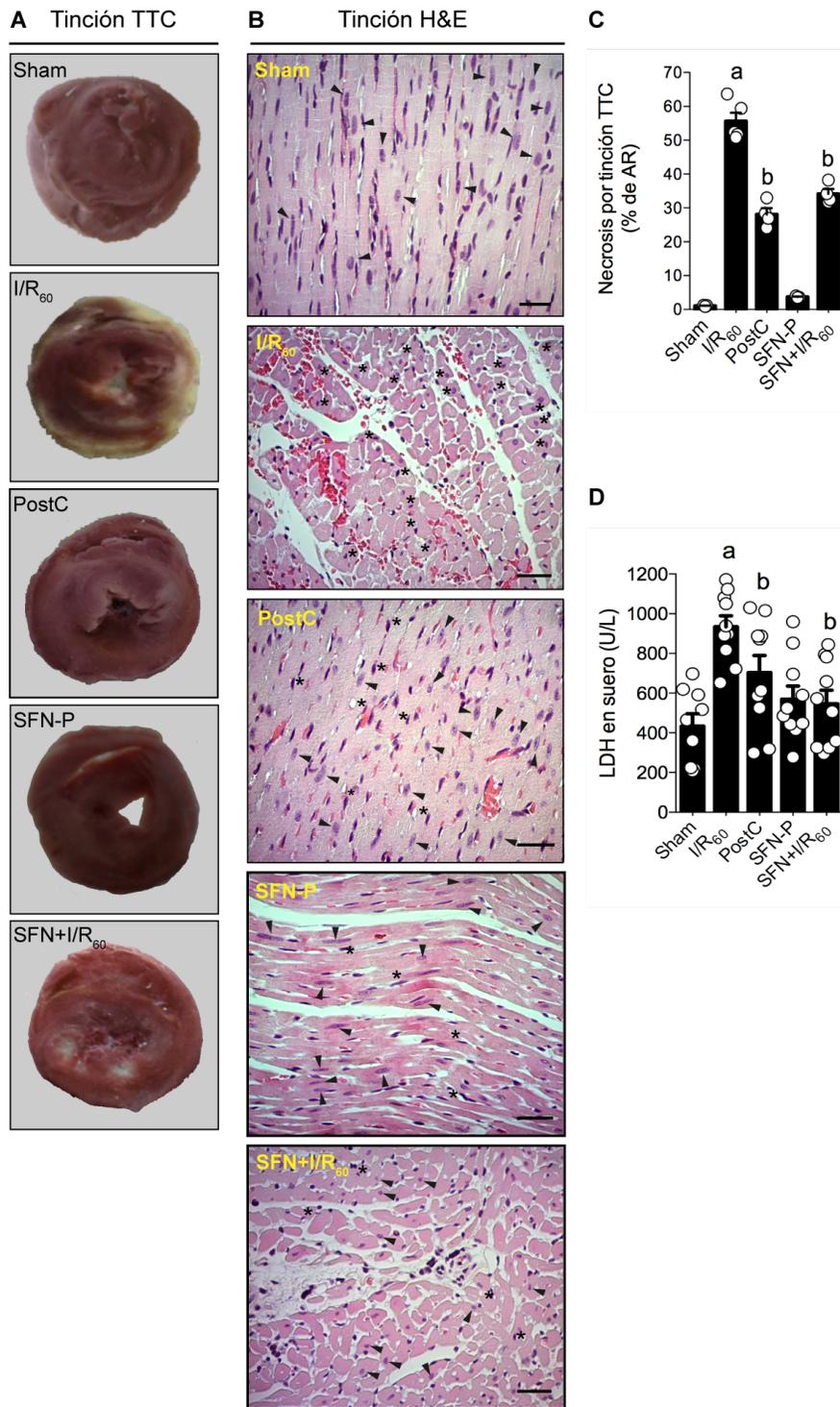
En este caso, relacionamos la preservación de la función y la estructura cardiaca con la reducción del estrés oxidante. Como se muestra en la Figura 19, en los corazones I/R<sub>60</sub> se incrementó a casi al doble la oxidación de proteínas ( $p \leq 0.05$ ) así como el contenido de malondialdehído ( $p \leq 0.05$ ), junto con una discreta, pero significativa, disminución en el cociente GSH/GSSG (Figura 19C). Aunque el PostC disminuyó ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de daño a estas biomoléculas, el pre-tratamiento con SFN (500 µg/Kg) fue ligeramente más efectivo. La acumulación de nitrotirosina (un índice de daño nitrosante) también se evaluó por inmunoblot. Nuestros resultados indicaron que la isquemia-reperfusión incrementó este producto de nitración en proteínas ( $p \leq 0.05$ ), sin cambios aparentes en el grupo SFN+I/R<sub>60</sub> (Figura 19D). En general, nuestros datos muestran que la disminución en el estrés oxidante, pero no del nitrosante, correlaciona con la preservación de la función cardiaca.

Grupo	FC (lat/min)	LVESP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+dp/dt (mmHg/s)	-dp/dt (mmHg/s)
<b>Sham</b>					
Basal	342 ± 9.7	113 ± 2.7	8 ± 0.8	5039 ± 244.8	3202 ± 184.6
<b>I/R<sub>60</sub></b>					
Basal	335 ± 6.7	108 ± 4.6	7 ± 1.1	4159 ± 343.5	2882 ± 239.7
IS <sub>30min</sub>	<b>263 ± 8.9<sup>b</sup></b>	<b>67 ± 2.4<sup>b</sup></b>	<b>2 ± 0.5<sup>b</sup></b>	3400 ± 377.5	2028 ± 407
Rep <sub>60min</sub>	<b>231 ± 7.9<sup>a,b</sup></b>	<b>59 ± 2.8<sup>a,b</sup></b>	<b>3 ± 0.4<sup>a,b</sup></b>	<b>2826 ± 114.6<sup>a,b</sup></b>	<b>1886 ± 187<sup>a,b</sup></b>
<b>PostC</b>					
Basal	362 ± 15.2	114 ± 4	9 ± 0.8	6274 ± 603.2	5613 ± 1135.6
IS <sub>30min</sub>	<b>295 ± 17.9<sup>b</sup></b>	<b>68 ± 3.9<sup>b</sup></b>	<b>5 ± 0.3<sup>b</sup></b>	5886 ± 647.5	4891 ± 1208.3
Rep <sub>60min</sub>	<b>276 ± 7.7<sup>d</sup></b>	<b>124 ± 7.3<sup>d</sup></b>	<b>9 ± 2.1<sup>d</sup></b>	<b>5419 ± 556.3<sup>d</sup></b>	<b>4675 ± 960.2<sup>d</sup></b>
<b>SFN-P</b>					
Basal	339 ± 7.6	110 ± 9.4	6 ± 1.2	5804 ± 365.5	4799 ± 254.3
Basal <sub>60min</sub>	333 ± 12.4	<b>132 ± 9.7<sup>a,b</sup></b>	<b>10 ± 1.4<sup>a,b</sup></b>	<b>5792 ± 247.7<sup>a</sup></b>	<b>6798 ± 693.8<sup>a,b</sup></b>
<b>SFN+I/R<sub>60</sub></b>					
Basal	334 ± 18.7	113 ± 10.8	7 ± 0.4	<b>7374 ± 908.7<sup>a</sup></b>	<b>6769 ± 997.4<sup>a</sup></b>
IS <sub>30min</sub>	<b>387 ± 19<sup>c</sup></b>	<b>148 ± 15.3<sup>c</sup></b>	<b>13 ± 2.3<sup>c</sup></b>	<b>7339 ± 703.7<sup>c</sup></b>	<b>8154 ± 1500.6<sup>c</sup></b>
Rep <sub>60min</sub>	<b>340 ± 20.7<sup>d</sup></b>	<b>168 ± 22<sup>d</sup></b>	<b>15 ± 2.4<sup>d</sup></b>	<b>8122 ± 649.2<sup>d</sup></b>	<b>8636 ± 1870.7<sup>d</sup></b>

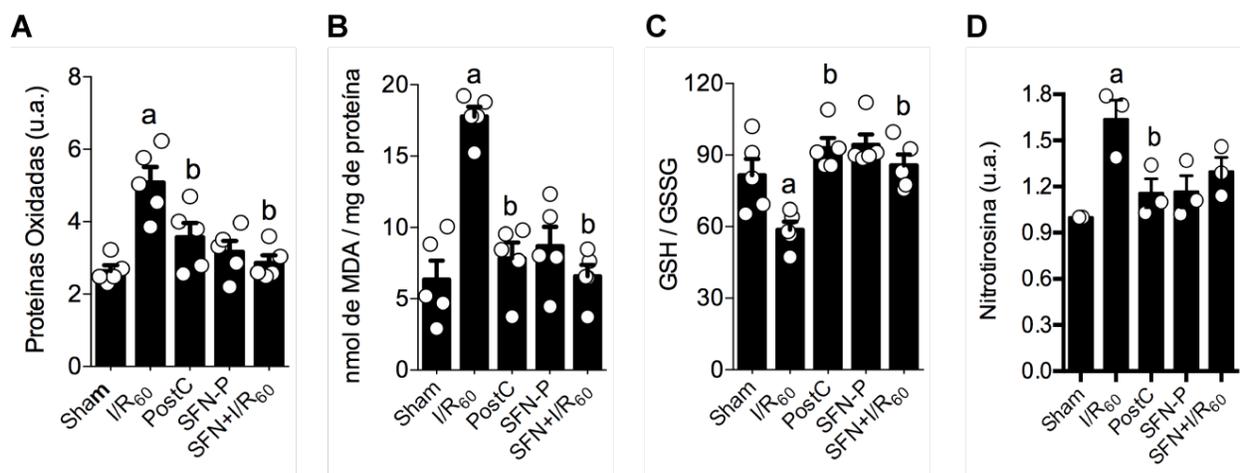
**Tabla 2 Efecto del PostC y SFN en la función cardiaca de ratas sometidas a isquemia-reperusión.** Los datos se expresan como la media ± EE de al menos 5-7 animales diferentes en cada grupo experimental. FC (frecuencia cardiaca), LVESP, LVEDP y ±dp/dt representan la frecuencia cardiaca, presión ventricular izquierda al final de la sístole, la presión ventricular izquierda al final de la diástole, el cambio máximo y mínimo en la tasa de la presión del ventrículo izquierdo, respectivamente. Los datos se obtuvieron al final de la estabilización, isquemia y reperusión. Los números en negro indican: <sup>a</sup> $p \leq 0.05$  vs. Basal del grupo Sham; <sup>b</sup> $p \leq 0.05$  vs. Basal en cada grupo; <sup>c</sup> $p \leq 0.05$  vs. IS<sub>30min</sub> en el grupo I/R<sub>60</sub> y <sup>d</sup> $p \leq 0.05$  vs. Rep<sub>60min</sub> en el grupo I/R<sub>60</sub>.

### 2.3.3 Respuesta inflamatoria

En primera instancia evaluamos a la subunidad p65 de NF-κB por inmunodetección en el tejido cardiaco, sin embargo, no apreciamos cambios significativos en el número de células inmunopositivas a p65 en ninguno de nuestros grupos experimentales (*Figura 20A*). Por lo que, evaluamos los niveles de las citocinas IL-1β, IL-6 y TNFα en todas las condiciones experimentales por ELISA. Tanto el contenido de IL-1β como de IL-6, incrementaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en el grupo I/R<sub>60</sub> (*Figura 20B y C*). El PostC solo ejerció un efecto a la baja en la IL-1β; mientras que en los animales pre-tratados con SFN (500 μg/Kg) el contenido de todas las citocinas disminuyó (*Figuras 20B-D*).



**Figura 18 Sulforafano disminuye el daño inducido por la isquemia-reperfusion.** (A) Secciones representativas del LV teñidas con cloruro de trifentiltetrazolio (TTC) y (B) con hematoxilina-eosina (H&E). Los cambios morfológicos del LV se analizaron por microscopía óptica (40×). (C) Análisis cuantitativo del tamaño del infarto. (D) Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en suero. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes. <sup>a</sup> $p \leq 0.05$  vs. Sham, <sup>b</sup> $p \leq 0.05$  vs. I/R<sub>60</sub>. Las puntas en flecha indican células integra y los asteriscos células picnóticas. AR: área de riesgo.



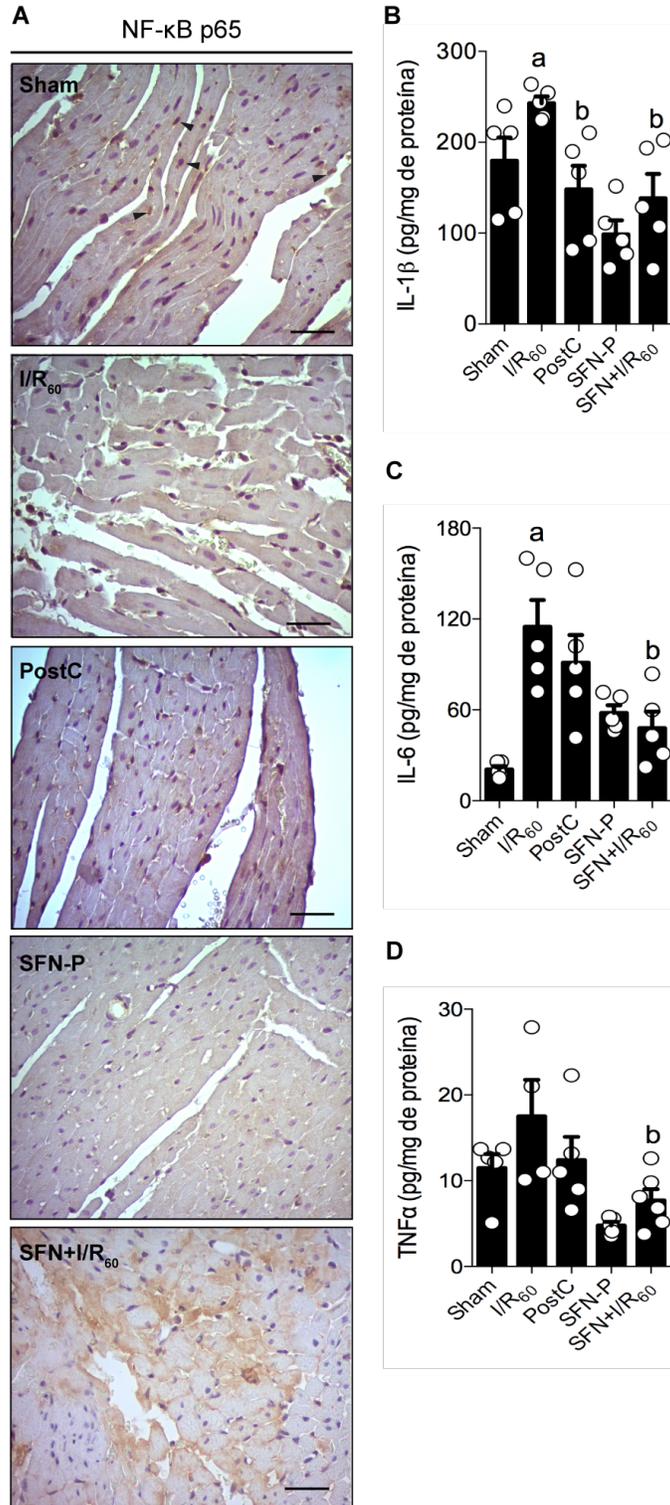
**Figura 19. Marcadores de daño por estrés oxidante y nitrosante.** (A) Oxidación de proteínas en homogenado total de tejido cardíaco. (B) Determinación de lipoperoxidación ensayado por las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). (C) Evaluación del estado redox celular por fluorimetría (GSH/GSSG). (D) Análisis cuantitativo de la proteína nitrotirosina en homogenado total. Cada columna representa la media  $\pm$  EE de al menos 5 animales diferentes.  $^ap \leq 0.05$  vs. Sham,  $^bp \leq 0.05$  vs. I/R<sub>60</sub>.

### 2.3.4 Activación de proteínas cinasas involucradas en la cardioprotección

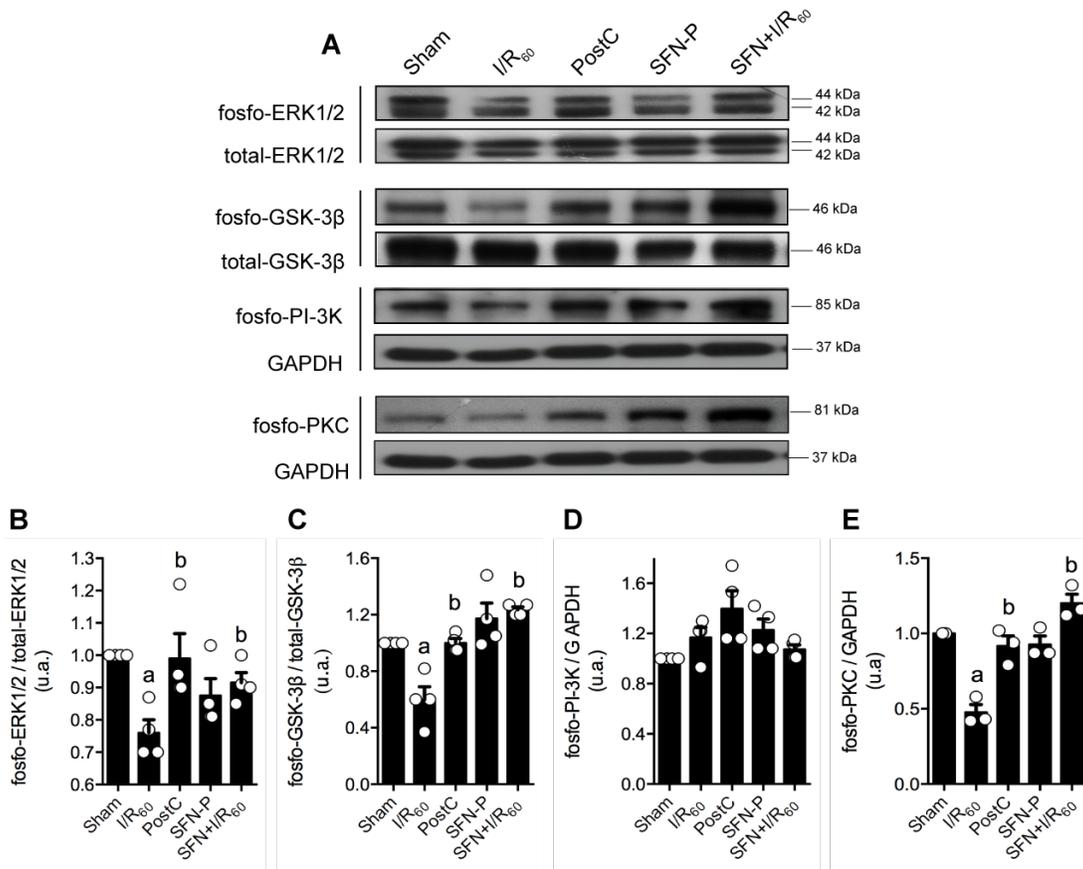
La señalización involucrada en la cardioprotección conferida por el PostC ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, el papel del SFN en la activación de dichas cinasas aún no es claro. Corroboramos que la activación endógena de ERK1/2, GSK-3 $\beta$  y PKC se inducen significativamente por el PostC en comparación con el grupo I/R<sub>60</sub> ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 21A). El pre-tratamiento con SFN, activa a todas las cinasas evaluadas (excepto PI-3K) al final de la reperusión. La fosforilación de GSK-3 $\beta$  y de PKC fue ligeramente superior que en el grupo PostC (Figura 21C y E), lo que indica que ambas estrategias activan mecanismos de protección comunes que podrían incidir en la regulación del factor Nrf2.

### 2.3.5 La activación de Nrf2 se asocia a la atenuación del estrés oxidante y a la cardioprotección en corazones PostC, pero no en corazones tratados con SFN.

Para evaluar si la activación de Nrf2 se asocia a la atenuación del estrés oxidante y a la cardioprotección tanto en corazones PostC como en corazones tratados con SFN, evaluamos el contenido de dos proteínas blanco reguladas por dicho factor de transcripción. Encontramos que el contenido de HO-1 disminuye (casi un 40%) en los animales sometidos a I/R<sub>60</sub> ( $p \leq 0.05$ ), el cual se restablece a valores similares a los del grupo Sham únicamente en el grupo SFN+I/R<sub>60</sub> (Figura 22A y B). La NQO1 incrementó también en los animales pre-tratados con 500  $\mu$ g/Kg de SFN (Figura 22C) en correlación directa con un aumento significativo de su actividad (Figura 22D,  $p \leq 0.05$ ); mientras que la maniobra del PostC sólo la eleva discretamente.



**Figura 20. Papel de la inflamación en ratas sometidas a isquemia-reperfusión.** (A) Secciones transversales del LV inmunoteñidas con NF- $\kappa$ B p65. Los cortes se analizaron por microscopía óptica (40x). Contenido de (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6 y (D) TNF $\alpha$ - en suero evaluadas por ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE de al menos 5 ratas diferentes en cada grupo experimental. <sup>a</sup> $p \leq 0.05$  vs. Sham, <sup>b</sup> $p \leq 0.05$  vs. I/R<sub>60</sub>

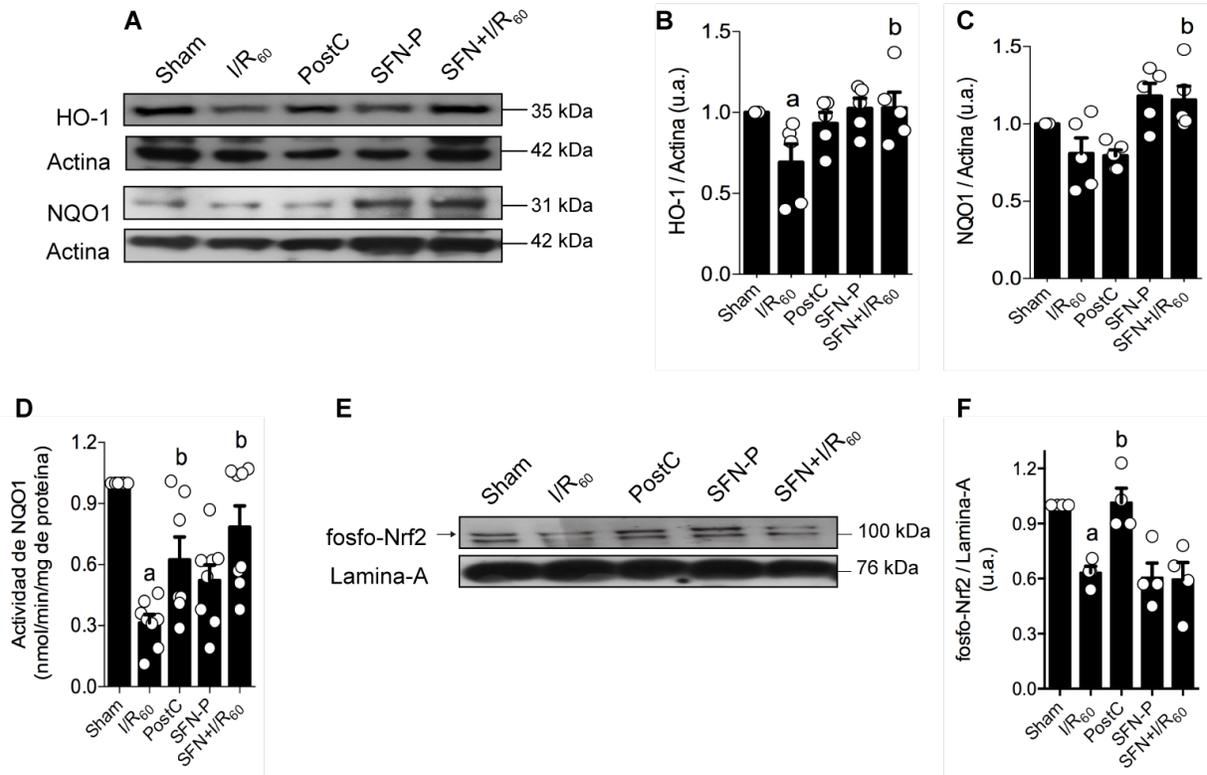


**Figura 21** Señalización celular inducida por el PostC y SFN. (A) Inmunoblot representativo de cinasas relacionadas con la cardioprotección. Análisis densitométrico de las cinasas (B) ERK1/2, (C) GSK-3β, (D) PI-3K y (E) PKC en tejido cardiaco. Cada columna representa la media  $\pm$  EE de al menos 3-4 ratas diferentes. <sup>a</sup> $p \leq 0.05$  vs. Sham, <sup>b</sup> $p \leq 0.05$  vs. I/R<sub>60</sub>

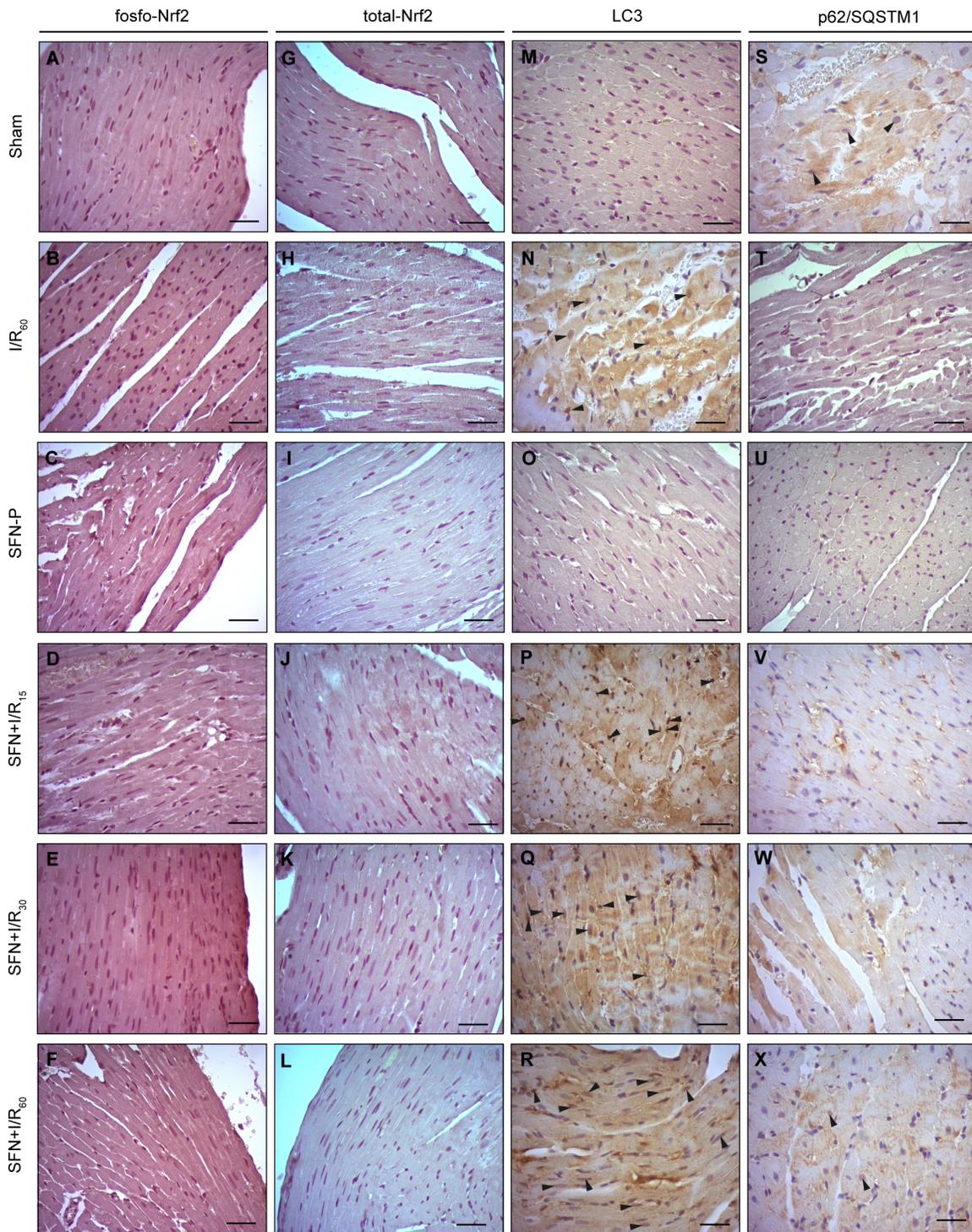
Subsecuentemente, evaluamos los niveles de Nrf2 fosforilado (fosfo-Nrf2) para relacionar el aumento en la actividad de las cinasas con la activación del factor de transcripción. Fosfo-Nrf2 no se incrementó en la fracción nuclear del grupo tratado con SFN (Figura 22F), a diferencia de lo observado en el grupo PostC (Figura 22E,  $p \leq 0.05$ ). Estos datos demuestran que Nrf2 participa en la protección ejercida por el PostC y sugieren que el efecto del SFN podría ser independiente de Nrf2, o bien que la fosforilación del factor ocurre antes de los 60 minutos de reperusión. Para evaluar esta posibilidad se midió mediante inmunohistoquímica el contenido de Nrf2 total y fosforilado a diferentes tiempos de reperusión. Sin embargo, no encontramos un aumento de ninguna de las dos formas en los núcleos ni en el citosol a los diferentes tiempos evaluados, en los grupos tratados con SFN (Figura 23A-L).

Finalmente evaluamos algunos marcadores de autofagia, ya que este proceso es crucial para eliminar proteínas y organelos dañados, manteniendo la producción de ATP y la homeostasis celular. Se evaluaron los niveles de p62/SQSTM1 (sequestrosome 1) y de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3),

marcadores característicos de agregados de proteínas ubiquitinadas y un indicador del flujo autofágico, respectivamente. Se observó un aumento de LC3 en el grupo I/R<sub>60</sub> en comparación con el grupo Sham (Figura 24L), el cual se mantuvo con el pre-tratamiento con SFN a los diferentes tiempos de reperfusión (Figura N, P, Q, y R). Mientras que, para p62, solo logramos apreciar un número limitado de células positivas a la proteína en el grupo Sham, el cual se mantuvo hasta los 60 min de reperfusión (Figura 23X).



**Figura 22. Evaluación de enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 y su activación en corazones post-acondicionados y tratados con SFN.** (A) Inmunoblot representativo de HO-1 y NQO1 en tejido cardiaco. Análisis densitométrico de (B) HO-1 y (C) NQO1. (D) Actividad de la enzima NQO1 por espectrofotometría. (E) Inmunoblot representativo de los niveles de fosfo-Nrf2 en la fracción nuclear de tejido cardiaco. (F) Análisis densitométrico de fosfo-Nrf2 en el núcleo. Cada columna representa la media  $\pm$  EE de 3-5 ratas diferentes.  $^a p \leq 0.05$  vs. Sham,  $^b p \leq 0.05$  vs. I/R<sub>60</sub>



**Figura 23 Papel de SFN en otros mecanismos de protección.** Imágenes representativas del LV inmunoteñidas con fosfo- y total-Nrf2, LC3B y p62 en diferentes tiempos de reperusión. Los cortes se analizaron por microscopía óptica (40x), las puntas de flecha indica aquellas células inmunopositivas al anticuerpo. Los resultados representan 1 experimento independiente.

### XIII. Discusión

En el corazón, el desbalance entre el suministro y la demanda de oxígeno conducen a la isquemia miocárdica generando efectos nocivos que pueden agravarse durante la reperfusión, provocando desde el deterioro contráctil hasta la muerte celular. La activación endógena de cinasas, en particular de los miembros de la vía RISK, confieren cardioprotección cuando se activan específicamente en el tiempo de la reperfusión [Rossello & Yellon, 2017]. Esto ha sido demostrado ampliamente desde 2002, cuando el grupo del Dr. Derek Yellon describió que el incremento en la fosforilación de ERK1/2 se asocia con la reducción del tamaño del infarto, efecto que se pierde luego de la administración de PD98059 (inhibidor de ERK1/2) [Schulman et al., 2002]. El acondicionamiento isquémico y diversos agentes farmacológicos como la insulina, bradicinina, adenosina o estatinas activan la vía de las RISK [Penna et al., 2009]. Por lo tanto, se le considera una cascada de señalización universal o una ruta común que comparten muchas terapias de cardioprotección. En línea con ello, se ha descrito que Nrf2 protege a cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos contra el daño oxidante al incrementar las rutas de destoxicación y la capacidad antioxidante [Wang et al., 2018]. Por ejemplo, compuestos como resveratrol significativamente aumentan la actividad de SOD y GSH disminuyendo el estrés oxidante en animales expuestos a isquemia-reperfusión.

Tomando en cuenta el papel positivo de los antioxidantes, en este trabajo nos planteamos evaluar si la protección conferida por el SFN se asocia con la actividad de estas cinasas en corazones reperfundidos. Se ha reportado que el SFN activa a Akt y a ERK1/2 en cardiomiocitos, en asociación con la activación de Nrf2 [Leoncini et al., 2011] y que en células HepG2 y en modelos *in vivo*, la activación de Nrf2/ARE junto con la inducción de HO-1 está mediada por SFN y depende de la activación de p38 [Keum et al., 2006]. Por otro lado, en células T24 de cáncer de vejiga humano, la translocación nuclear de Nrf2 inducida por SFN se inhibe con SB202190 (inhibidor de p38) y se asocia con la regulación a la baja de GST, de la tioredoxina reductasa-1 (TR-1) así como de la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) [Shan et al., 2010]. En este sentido, Piao et al. [2010] reportaron que el efecto protector del SFN en el daño por reperfusión podría estar mediado por la ruta antioxidante y los canales de potasio mitocondrial dependiente de ATP (mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), pues la apertura de estos canales reduce la generación de ERO provenientes de la mitocondria.

Nuestros datos muestran que, aunque ambas estrategias incrementan la fosforilación de ERK1/2, GSK-3 $\beta$  y PKC (*Figura 21*), las vías de protección cascada abajo siguen vías diferentes. Mientras que la translocación nuclear de Nrf2 se observa a los 60 min de reperfusión en los corazones PostC, en el grupo SFN+I/R<sub>60</sub> no se detecta el factor aun cuando los corazones están protegidos (*Figura 22*), lo que sugiere que la activación pudo ocurrir durante la reperfusión temprana o que la cardioprotección es independiente de Nrf2. El aumento en la actividad y el contenido de la NQO1 nos hace pensar en la primera posibilidad, aunque existen reportes del efecto protector del SFN de manera independiente de Nrf2. Por ejemplo, dosis altas de SFN administradas a ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup> disminuyen parcialmente la respuesta inflamatoria inducida

por lipopolisacárido [Holloway et al., 2016] y evita la formación de ampollas en la piel a través de una ruta tanto dependiente como independiente del factor de transcripción Nrf2 [Kerns et al., 2010]. Se ha descrito que el SFN puede regular otros procesos celulares relacionados con la sobrevivencia celular como apoptosis, inhibición de la angiogénesis y desacetilación de histonas [Myzak & Dashwood, 2006]. Por ejemplo, Jackson & Singletary [2004] demuestran que altas dosis de SFN ( $\geq 100 \mu\text{mol/l}$ ) detiene el ciclo celular en cáncer de mama.

Más allá de la respuesta antioxidante relacionada a la administración de SFN, se ha demostrado que también actúa a través de la regulación de la respuesta inflamatoria vía la ruta NF- $\kappa$ B. El isotiocianato es capaz de inhibir la fosforilación de I $\kappa$ B, la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y su capacidad de unión al ADN, sin embargo, el mecanismo de exacto, aún no se conoce [Heiss et al., 2001; Kensler et al., 2013; Greaney et al., 2016; Santín-Márquez et al., 2018]. Después del tratamiento con SFN, reguladores maestros de la inflamación como TNF $\alpha$  e IL-6, junto con la expresión de NF- $\kappa$ B y la fosforilación de I $\kappa$ B disminuyen [Negi et al., 2011]. Incluso, la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, se inhiben de manera dosis dependiente con SFN en células T, esto debido a que SFN puede prevenir la interacción directa entre NF- $\kappa$ B y su secuencia consenso mediante la modulación de los grupos tiol [Cheker et al., 2015]. Nuestros datos indican que SFN tiene la capacidad de significativamente reducir la generación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) luego de la isquemia-reperfusión (*Figura 20*), por lo que el papel anti-inflamatorio de SFN no puede descartarse. En nuestras condiciones experimentales, el SFN logra incrementar la batería antioxidante más no la acumulación nuclear de Nrf2 (*Figura 22*). Cho et al. [2019], describió que SFN regula a la alta un grupo de genes que participan en la OxPhos, el metabolismo energético y la protección cardiovascular sólo en ratones *wild type*. Interesantemente, la abundancia de genes implicados en la maquinaria mitocondrial disminuyen en ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup> tratados con SFN; además, este grupo de trabajo sugiere que el NF- $\kappa$ B podría ser central en las redes de transcriptoma afectadas por SFN. Por lo tanto, otros blancos de protección podrían estar involucrados, adicionales a la inflamación y la respuesta antioxidante.

En cuanto a la posible regulación de procesos de autofagia por SFN en corazón, existen pocos reportes [Zhang et al., 2014]. La **autofagia** es el proceso mediante el cual se degradan organelos dañados, bacterias intracelulares o agregados de proteínas [Lamark et al., 2017]. Comprende tres principales rutas que median la degradación lisosomal de cargas intracelulares. Estas son la macroautofagia (referida como autofagia), microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA, *chaperone-mediated autophagy*) [Mizushima & Komatsu, 2011].

La autofagia ha sido descrita como un arma de doble filo en la I/R miocárdica [Ma et al., 2015]. En la fase de isquemia, las células inducen autofagia celular removiendo basura metabólica, reciclando nutrientes y ayudando a mantener la sobrevivencia del miocito [Przyklenk et al., 2012]. En ausencia de nutrientes y energía, las células muestran actividad inhibitoria de mTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*)

mientras que ULK1 (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*) se activa, ambos controlando a Atg junto con la formación de la membrana de la autofagia [Gustafsson & Gottlieb, 2008]. La extensión de las vesículas autofágicas requieren la participación de un complejo de Atg junto con LC3, dos sistemas de unión a la ubiquitinación. El LC3-I libre inicial en el citosol se une a fosfatidiletanolamina y se lipida para formar LC3-II, que se localiza en la membrana fagocítica. La autofagia excesiva al inicio de la reperfusión, puede inducir un consumo progresivo de constituyentes celulares que llevan a la muerte autofágica [Ma et al., 2015], además, el aumento de las ERO activan al sistema de ubiquitin-proteosoma para degradar a Bcl-2 y llevar a la estimulación de Beclina-1, que induce la autofagia [Wu et al., 2018]. Estudios confirman que la autofagia se promueve en la etapa inicial de la reperfusión. Sin embargo, no es capaz de eliminar por completo a las mitocondrias disfuncionales durante la reperfusión, ya que la sobrecarga de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  y el aumento de ERO, exceden la capacidad de depuración autofágica [Qin et al., 2016]. En este sentido, Matsui et al. [2007] demostraron que en cardiomiocitos, los niveles del cociente LC3-II/LC3-I incrementan en la reperfusión, mientras Xiao et al. [2011] describen que la autofagia contribuye al daño en miocitos durante la re-oxigenación.

Los resultados presentados en la *Figura 23*, muestran que el SFN induce un incremento de LC3 vs. el grupo isquémico-reperfundido; a este respecto, Decker & Wildenthal [1980] reportaron un aumento de vacuolas autofágicas en miocitos sometidos a diferentes tiempos de hipoxia; interesantemente, la reperfusión extendió la autofagia lisosomal. Los autores indican que este proceso es importante en la reparación que las células cardíacas inician durante y después de la hipoxia. Por lo tanto, es necesario evaluar el cociente LC3-II/I en nuestras condiciones para determinar el flujo autofágico.

A pesar de no apreciar cambios significativos de p62/SQSTM1 (proteína anti-autofágica) luego de la administración del SFN a los diferentes tiempos de reperfusión (*Figura 23S-X*), se conoce que la reducción en p62/SQSTM1 indica una actividad autofágica menor. Sin embargo, no es el único papel adjudicado a p62; por ejemplo, la degradación de Keap1 por la autofagia mediada por p62 no es un control de calidad de la proteína, sino una señalización [Lamark et al., 2017]. De hecho, se ha descrito un circuito de retroalimentación de p62-Nrf2, el cual no solo se induce por estrés oxidante, sino también por una autofagia ineficiente que causa la acumulación de p62 [Jain et al., 2010; Komatsu et al., 2010].

Además de p62, una de las principales características de la ruta autofágica mediada por chaperonas, es la presencia de un receptor llamado LAMP2A (*lysosomal associated membrane proteína 2A*), por lo que la intervención de otras proteínas implicadas en todo el proceso de autofagia no debe descartarse. A este respecto, Nrf2 se une y activa al menos dos ARE's en LAMP2A, controlando su expresión basal. En ratones *Nrf2<sup>-/-</sup>* la autofagia mediada por chaperonas es escasamente detectable, indicando que el factor de transcripción juega un papel importante al regular este tipo de autofagia [Pajares et al., 2018].

El uso de compuestos exógenos con propiedades antioxidantes y su impacto en la autofagia ha sido un tema actual de investigación. En la I/R (asociada a co-morbilidades), el N-acetil-L-cisteína ha mostrado

conferir cardioprotección inhibiendo la autofagia excesiva [Wang et al., 2017]. Por su parte, el post-entrenamiento con epigallocatequina-3-galato alivia del daño por reperfusión a través de la restauración del flujo autofágico, asociado con la ruta de señalización PI-3K/Akt [Xuan & Jian, 2016]. Además, la macroautofagia está regulada por otras rutas de señalización como la vía ERK, la cual puede inducir a LC3-I para que se convierta a LC3-II y promover la producción de la proteína Beclina-1 y la generación de autofagosomas [Zeng et al., 2012]. Al inhibir dicha ruta, dichas proteínas se reducen, incrementando la expresión de p62 en miocitos sometidos a H/R, sugiriendo una supresión de la autofagia [Wang et al., 2016]. En este mismo contexto y, sin descartar la participación de Nrf2, la sobre-expresión de HO-1 indujo un aumento de LC3-II y disminución de p62 después de la re-oxigenación, protegiendo la a la mitocondria [Chen et al., 2016].

Finalmente, no deberíamos omitir la inducción de otros procesos celulares que se favorecen por el tratamiento con SFN. Negrette-Guzmán et al. [2017] sugieren que este compuesto regula la biogénesis y dinámica mitocondrial en células tumorales. Por su parte, Angeloni et al. [2009] mostró que el SFN protege a las células cardíacas de ratas neonatales del daño oxidante al inducir una serie de enzimas antioxidantes. Recientemente, la acción de SFN en la activación de otros factores de transcripción, ha sido explorado. De hecho, se ha descrito que SFN inhibe a Drp1 (*Dynamin related protein 1*) de manera independiente del factor de transcripción Nrf2 [O'Mealey et al., 2017], sugiriendo que este compuesto podría activar vías alternas a las reguladas por la señalización Keap1/Nrf2/ARE, tal como PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 alpha*) [Corssac et al., 2018].

## XIV. Conclusiones Generales

1. El 3-NP ejerce efectos diferenciales en el tejido cardiaco dependiendo de la edad. La pérdida de los efectos observados en animales viejos podría estar relacionado a la respuesta hormética previamente generada, en la cual el umbral para el daño oxidante se alcanzó y podría no ser superada por la neurotoxina. Nuestros datos muestran que la respuesta antioxidante de Nrf2 es funcional en animales adultos, pero se compromete en animales viejos, posiblemente debido a la desregulación de los componentes río abajo de la cascada de señalización de Nrf2.
2. En el modelo de isquemia-reperfusión, nuestros datos indican que el tratamiento con SFN en animales que cursan por un evento de isquemia y perfusión es más efectivo que la maniobra mecánica del PostC, ya que logra disminuir la respuesta inflamatoria y el estrés oxidante. Sin embargo, el mecanismo de protección podría no estar mediado únicamente por el factor de transcripción Nrf2, sino que puede involucrar otros procesos celulares como la inhibición de NF- $\kappa$ B.
3. Concluimos que, independientemente de la situación patológica asociada al estrés oxidante, el mecanismo protección inducido (de manera endógena o exógena) podría involucrar cascadas de señalización adicionales al factor de transcripción Nrf2, asegurando la sobrevivencia celular y del tejido.

## X. Perspectivas

De manera general, las perspectivas para ambas condiciones experimentales estudiadas en esta tesis son:

- a. Intentar modular la regulación negativa de Nrf2 en el envejecimiento podría dar lugar a nuevas estrategias para desarrollar intervenciones que ayuden a incrementar la vida útil de los adultos mayores. La meta de retrasar el deterioro en el envejecimiento es proveer una mejor calidad de vida junto con un menor riesgo a desarrollar enfermedades crónicas degenerativas en esta etapa de la vida. Aunado a ello, el estudio en ratas con una edad menor (18 meses) podría darnos más información sobre la posible respuesta de adaptación a esta edad, tomando en cuenta la alta tasa de mortalidad en los animales envejecidos.
- b. La participación de procesos celulares alternos al Nrf2 han tenido un mayor auge en los últimos años. Particularmente, la integridad de la mitocondria en el contexto de la isquemia-reperfusión ha sido un tema interesante de investigación. El papel de la biogénesis mitocondrial, autofagia y dinámica mitocondrial podrían ser excelentes candidatos para ser evaluados en un modelo de cultivo primario de cardiomiocitos y discernir los mecanismo de protección.
- c. Adicionalmente, estamos interesados en proponer el estudio de moléculas pro-oxidantes que puedan ser “posibles blancos terapéuticos” en la clínica durante eventos de daño como el infarto agudo al miocardio. Aunque estamos lejos de lograrlo, estudios básicos como los realizados en el laboratorio, servirán como cimientos de su estudio y posible aplicación.

## XV. Referencias

- Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, Giuseppe GL, Biondi-Zoccai, Houser JE, Qureshi IZ, Ownby ED, Gustini E, Biasucci LM, Severino A, Capogrossi MC, Vetovec GW, Crea F, Baldi A, Kukreja RC, Dobrina A (2008) Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 117:2670–83
- Abiko Y, Miura T, Phuc BH, Shinkai Y, Kumagai Y (2011) Participation of covalent modification of Keap1 in the activation of Nrf2 by tert-butylbenzoquinone, an electrophilic metabolite of butylated hydroxyanisole. *Toxicol Appl Pharmacol.* 255:32-9
- Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R (2010) Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochem Pharmacol.* 80:1613-31
- Aguilera G, Colín-González AL, Rangel-López E, Chavarría A, Santamaría A (2018) Redox signaling, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal.* 28:1626-51
- Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Ventura-Gallegos JL, Lazzarini R, Galván-Arzate S, González-Puertos VY, Morán J, Santamaría A, Königsberg M (2014) Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment. *Neurobiol Aging* 35:1901–12
- Alexi T, Hughes PE, Knusel B, Tobin AJ (1998) Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague–Dawley rats but not in BALA/cByJ mice. *Exp. Neurol.* 153:74–93
- Alston TA, Mela L, Bright HJ (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substances of Indigofera, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3767–71
- Andrich J, Schmitz T, Saft C, Postert T, Kraus P, Epplen JT, Przuntek H, Agelink MW (2002) Autonomic nervous system function in Huntington’s disease. *J Neurol Neurosur Psychiatry.* 72:726-31
- Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S (2009) Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem.* 57:5615-22
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raïsky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 111:194-7
- Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S (2003) Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med.* 24:219-30
- Bacsi A, Woodberry M, Widger W, Papaconstantinou J, Mitra S, Peterson JW, Boldogh I (2006) Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells. *Mitochondrion* 6:235–44
- Bai Y, Wang X, Zhao S, Ma C, Cui J, Zheng Y (2015) Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:407580
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13:4181–92
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT (1993a) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13:4181-92

- Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT (1993b) Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem.* 61:1147-50
- Beckman KB, Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem.* 272:19633-6
- Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P (1980) Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:5216-20
- Boengler K, Lochnit G, Schulz R (2018) Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 315:H1215-31
- Bonetto JH, Fernandes RO, Seolin BG, Müller DD, Teixeira RB, Araujo AS, Vassallo D, Schenkel PC, Belló-Klein A (2016) Sulforaphane improves oxidative status without attenuating the inflammatory response or cardiac impairment induced by ischemia-reperfusion in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 94:508-16
- Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR (1997) 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci. Biobehv. Rev.* 21:289-93
- Botti MG, Taylor MG, Botting NP (1995) Studies on the mechanism of myrosinase—investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity. *J Biol Chem.* 270:20530-5
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128:617-30
- Brouillet E (2014) The 3-NP model of striatal neurodegeneration. *Curr Protoc Neurosci.* 67:9.48.1-14
- Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59:427-68
- Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Conde F, Palfi S, Hantraye P (1998) Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70:794-805
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover pathophysiological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem.* 95:1521-40
- Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF (1993) Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 60:356-9
- Brown DI, Griendling KK (2015) Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res.* 116:531-49
- Buelna-Chontal M, Guevara-Chávez JG, Silva-Palacios A, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverrí J, Zazueta C (2014) Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radic Biol Med.* 74:145-56
- Buffenstein R, Edrey YH, Yang T, Mele J (2008) The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age (Dordr).* 30:99-109
- Bøtker HE, Hausenloy D, Andreadou I, Antonucci S, Boengler K, Davidson SM, Deshwal S, Devaux Y, Di Lisa F, Di Sante M, Efentakis P, Femminò S, García-Dorado D, Giricz Z, Ibanez B, Iliodromitis E, Kaludercic N, Kleinbongard P, Neuhäuser M, Ovize M, Pagliaro P, Rahbek-Schmidt M, Ruiz-Meana M, Schlüter KD, Schulz R, Skyschally A, Wilder C, Yellon DM, Ferdinandy P, Heusch G (2018) Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 113:39
- Cabrera-Fuentes HA, Aragonés J, Bernhagen J, Boening A, Boisvert WA, Bøtker HE, Bulluck H, Cook S, Di Lisa F, Engel FB, Engelmann B, Ferrazzi F, Ferdinandy P, Fong A, Fleming I, Gnaiger E, Hernández-Reséndiz S, Kalkhoran SB, Kim MH, Lecour S, Liehn EA, Marber MS, Mayr M, Miura T, Ong SB, Peter K, Sedding D, Singh

- MK, Suleiman M, Schnittler HJ, Schulz R, Shim W, Tello D, Vogel CW, Walker M, Li QO, Yellon DM, Hausenloy DJ, Preissner KT (2016) From basic mechanisms to clinical applications in heart protection, new players in cardiovascular diseases and cardiac theranostics: meeting report from the third international symposium on "New frontiers in cardiovascular research". *Basic Res Cardiol.* 111:69
- Cadet J, Wagner JR (2013) DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a012559
- Calabrese EJ (2008) Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7:8–20
- Cankar K, Melik Z, Kobal J, Starc V (2018) Evidence of cardiac electrical remodeling in patients with Huntington disease. *Brain Behav.* 8:e01077
- Castillo C, Reyes G, Rosas-Lezama MA, Valencia I, Hong E (1994) Analysis of the cardiodepressor action of 3-nitropropionic acid. *Proc West Pharmacol. Soc.* 37:41–42
- Chen D, Jin Z, Zhang J, Jiang L, Chen K, He X, Song Y, Ke J, Wang Y (2016) HO-1 Protects against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Mitochondrial Dysfunction in H9c2 Cardiomyocytes. *PLoS One.* 11:e0153587
- Chen YR, Zweier JL (2014) Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 114:524–37
- Cho HY, Miller-DeGraff L, Blankenship-Paris T, Wang X, Bell DA, Lih F, Deterding L, Panduri V, Morgan DL, Yamamoto M, Reddy AJ, Talalay P, Kleeberger SR (2019) Sulforaphane enriched transcriptome of lung mitochondrial energy metabolism and provided pulmonary injury protection via Nrf2 in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 364:29–44
- Cho KJ, Kim GW (2015) Differential caspase activity in the cortex and striatum with chronic infusion of 3-nitropropionic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 465:631–37
- Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 515:431–35
- Chu XY, Liu YM, Zhang HY (2017) Activating or inhibiting Nrf2? *Trends Pharmacol Sci.* 38:953–55
- Clarke JD, Riedl K, Bella D, Schwartz SJ, Stevens JF, Ho E (2011) Comparison of isothiocyanate metabolite levels and histone deacetylase activity in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement. *J Agric Food Chem.* 59:10955–63
- Clemensson EKH, Novati A, Clemensson LE, Riess O, Nguyen HP (2019) The BACHD rat model of Huntington disease shows slowed learning in a Go/No-Go-like test of visual discrimination. *Behav Brain Res.* 359:116–26
- Cooper AJL, Hanigan MH (2010) Enzymes involved in processing glutathione conjugates. *Comprehensive Toxicology.* (2nd edition) 4:323–66
- Correa F, Buelna-Chontal M, Hernández-Reséndiz S, García-Niño WR, Roldán FJ, Soto V, Silva-Palacios A, Amador A, Pedraza-Chaverrí J, Tapia E, Zazueta C (2013) Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radic Biol Med.* 61:119–29
- Corssac GB, Campos-Carraro C, Hickmann A, da Rosa Araujo AS, Fernandes RO, Belló-Klein A (2018) Sulforaphane effects on oxidative stress parameters in culture of adult cardiomyocytes. *Biomed Pharmacother.* 104:165–

- Costantini D, Monaghan P, Metcalfe NB (2014) Prior hormetic priming is costly under environmental mismatch. *Biol. Lett.* 10:20131010
- Critchley BJ, Isalan M, Mielcarek M (2018) Neuro-cardiac mechanisms in Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. *Front Physiol.* 9:559
- Crompton M, Ellinger H, Costi A (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 255:357-60
- Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM (1999) The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp.* 66:167-79
- Cullinan SB, Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 279:20108-17
- Cullinan SB, Zhang D, Hannink N, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA (2003) Nrf2 is direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol.* 23:7198-209
- Cutler TS, Park S, Loh DH, Jordan MC, Yokota T, Roos KP (2017) Neurocardiovascular deficits in the Q175 mouse model of Huntington's diseases. *Physiol Rep.* 5:e13289
- D'Autr aux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:813-24
- Davies JMS, Cillard J, Friguet B, Cadenas E, Cadet J, Cayce R, Fishmann A, Liao D, Bulteau AL, Derbr e F, R ebillard A, Burstein S, Hirsch E, Kloner RA, Jakowec M, Petzinger G, Sauce D, Sennlaub F, Limon I, Ursini F, Maiorino M, Economides C, Pike CJ, Cohen P, Salvayre AN, Halliday MR, Lundquist AJ, Jakowec NA, Mechta-Grigoriou F, Mericskay M, Mariani J, Li Z, Huang D, Grant E, Forman HJ, Finch CE, Sun PY, Pomatto LCD, Agbulut O, Warburton D, Neri C, Rouis M, Cillard P, Capeau J, Rosenbaum J, Davies KJA (2017) The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *Geroscience.* 39:499-550
- Decker RS, Wildenthal K (1980) Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol.* 98:425-44
- Deepa SS, Pharaoh G, Kinter M, Diaz V, Fok WC, Riddle K, Pulliam D, Hill S, Fischer KE, Soto V, Georgescu C, Wren JD, Viscomi C, Richardson A, Van Remmen H (2018) Lifelong reduction in complex IV induces tissue-specific metabolic effects but does not reduce lifespan or healthspan in mice. *Aging Cell.* 25:e12769
- Dell'agnello C, Leo S, Agostino A, Szabadkai G, Tiveron C, Zulian A, Prella A, Roubertoux P, Rizzuto R, Zeviani M (2007) Increased longevity and refractoriness to Ca<sup>2+</sup>-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum Mol Genet.* 16:431-44
- Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, and Bernardi P (2001) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276:2571-75
- Diguet E, Petit F, Escartin C, Cambon K, Bizat N, Dufour N, Hantraye P, D eglon N, Brouillet E (2009) Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PLoS One* 4:e4637
- Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Kostov RV, Kensler TW (2017) KEAP1 and Done? Targeting the NRF2 Pathway with Sulforaphane. *Trends Food Sci Technol.* 69:257-269
- Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Talalay P (2004) Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods Enzymol.* 382:423-48

- Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Kazantsev AG (2018) The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. *FEBS J.* 285:3576-3590
- Dinkova-Kostova AT, Wang XJ (2011) Induction of the Keap1/Nrf2/Are pathway by oxidizable diphenols. *Chem Biol Interact.* 192:101-6
- Done AJ, Gage MJ, Nieto NC, Traustadóttir T (2016) Exercise-induced Nrf2-signaling is impaired in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 96:130-8
- Dongworth RK, Hall AR, Burke N, Hausenloy DJ (2014) Targeting mitochondria for cardioprotection: examining the benefit for patients. *Future Cardiol.* 10:255-72
- Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM (2015) Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochem Res.* 40:2570-82
- Dröse S, Brandt U (2012) Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 748:145-69
- Ekeloef S, Halladin N, Fonnes S, Jenses SE, Zaremba T, Rosenberg J, Jonsson G, Aarøe J, Gasbjerg LS, Rosenkilde MM, Gögenur I (2017) Effect of intracoronary and intravenous melatonin on myocardial salvage index in patients with ST-elevation myocardial infarction: A randomized placebo controlled trial. *J Cardiovasc Transl Res.* 10:470-9
- Eltzschig HK, Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion from mechanism to translation. *Nat Med.* 17:1391-401
- Engler R, Covell JW (1987) Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog. *Circulation Research* 61:20-28
- Foguem C, Kamsu-Foguem B (2016) Neurodegeneration in tauopathies and synucleinopathies. *Rev Neurol (Paris)* 172:709-14
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurements, and biosynthesis. *Mol Aspect Med.* 30:1-12
- Forster T, Rausch V, Zhang Y, Isayev O, Heilmann K, Schoensiegel F, Liu L, Nessling M, Richter K, Labsch S, Nwaeburu CC, Mattern J, Gladkich J, Giese N, Werner J, Schemmer P, Gross W, Gebhard MM, Gerhauser C, Schaefer M, Herr I (2014) Sulforaphane counteracts aggressiveness of pancreatic cancer driven by dysregulated Cx43-mediated gap junctional intercellular communication. *Oncotarget.* 5:1621-34
- Frohlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ (2013) Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J* 34:1714-22
- Fu MH, Wu CW, Lee YC, Hung CY, Chen IC, Wu KLH (2018) Nrf2 activation attenuates the early suppression of mitochondrial respiration due to the  $\alpha$ -synuclein overexpression. *Biomed J.* 41:169-83
- Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, Podewski E, Schieffer B, Rose-John S, Drexler H (2003) Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *The FASEB Journal* 17:2118-20
- Gabrielson KL, Hogue BA, Bohr VA, Cardounel AJ, Nakajima W, Kofler J, Zweier JL, Rodriguez ER, Martin LJ, de Souza-Pinto NC, Bressler J (2001) Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces cardiac and neurotoxicity differentially in mice. *Am. J. Pathol.* 159:1507-20
- Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Maldonado P.D. Vázquez-Román B. Ríos C. Santamaría A (2005) Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem Toxicol.* 43:1037-45

- Gaspar A, Lourenco AP, Pereira MA, Azevedo P, Roncon-Albuquerque R Jr, Marques J, Leite-Moreira AF (2018) Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI). *Basic Res Cardiol.* 113:14
- Gharavi N, Haggarty S, El-Kadi AO (2007) Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr Drug Metab.* 8:1–7
- Giustarini D, Colombo G, Garavaglia ML, Astori E, Portinaro NM, Reggiani F, Badalamenti S, Aloisi AM, Santucci A, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I (2017) Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med.* 112:360-375
- Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M (2007) Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H1654-61
- Gottlieb RA (2011) Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 16:233-8
- Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KJ, Odelberg SJ, Firpo MA, Paine 3rd R, Hoidal JR, Abel ED, Rajasekaran NS (2012) Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One* 7:e45697
- Greaney AJ, Maier NK, Leppla SH, Moayeri M (2016) Sulforaphane inhibits multiple inflammasomes through an Nrf2-independent mechanism. *J Leukoc Biol.* 99:189-99
- Griffiths EJ, Halestrap AP (1993) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 307:93-8
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol.* 39:385-9
- Gunčová I, Látr I, Mazurová Y (2011) The neurodegenerative process in a neurotoxic rat model and in patients with Huntington's disease: histopathological parallels and differences. *Acta Histochem.* 113:783-92
- Gustafsson AB, Gottlieb RA (2008) Eat your heart out: Role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion. *Autophagy.* 4:416-21
- Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML (1999) Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation.* 99:546-51
- Hariharan A, Shetty S, Shirole T, Jagtap AG (2014) Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology* 45:139-48
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11:298–300
- Hartman MH, Vreeswijk-Baudoin I, Groot HE, van de Kolk KW, de Boer RA, Mateo Leach I, Vliegthart R, Sillje HH, van der Harst P (2016) Inhibition of Interleukin-6 Receptor in a Murine Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion. *PLoS One.* 11:e0167195
- Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inserte J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana

- M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D (2016) Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol.* 111:70
- Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM (2005) The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* 15:69–75.
- Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT (2010) Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal.* 13:1713-48
- He F (1987) Extrapyramidal lesions induced by mildewed sugarcane poisoning. Three cases report. *Chin Med J* 67:395–96
- He F, Zhang S, Qian F, Zhang C (1995) Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology.* 45:2178-83
- Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhäuser C (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem.* 276:32008-15
- Hernández-Echeagaray E, Gínez N, Ruelas A, Mendoza E, Rodríguez-Martínez E, Antuna-Bizarro R (2011) Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Neurol Sci.* 32:241-254
- Hernández-Reséndiz S, Chinda K, Ong SB, Cabrera-Fuentes H, Zazueta C, Hausenloy DJ (2018b) The role of redox dysregulation in the inflammatory response to acute myocardial ischaemia-reperfusion injury-Adding fuel to the fire. *Curr Med Chem.* 25:1275-93
- Hernández-Reséndiz S, Muñoz-Vega M, Contreras WE, Crespo-Avilan GE, Rodríguez-Montesinos J, Arias-Carrión O, Pérez-Méndez O, Boisvert WA, Preissner KT, Cabrera-Fuentes HA (2018a) Responses of endothelial cells towards ischemic conditioning following acute myocardial infarction. *Cond Med.* 1:247-58
- Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, de los Santos S, Román-Anguiano NG, Flores M, de la Peña A, Flores PL, Fernández-G JM, Coral-Vázquez RM, Zazueta C (2015) Reduction of no-reflow and reperfusion injury with the synthetic 17 $\beta$ -aminoestrogen compound Prolame is associated with PI3K/Akt/eNOS signaling cascade. *Basic Res Cardiol.* 110:1–12
- Hernández-Reséndiz S, Roldán FJ, Correa F, Martínez-Abundis E, Osorio-Valencia G, Ruiz-de-Jesús O, Alexander-Rosas E, Viguera RM, Franco M, Zazueta C (2013) Postconditioning protects against reperfusion injury in hypertensive dilated cardiomyopathy by activating MEK/ERK1/2 signaling. *J Card Fail.* 19:135-46
- Heusch G (2013) Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet.* 381:166-75
- Heusch G (2015) Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 116:674–99
- Hissin P.J, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74:214-26
- Hoffman GR (2009) A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response.* 7:1-51
- Holloway PM, Gillespie S, Becker F, Vital SA, Nguyen V, Alexander JS, Evans PC, Gavins FNE (2016) Sulforaphane induces neurovascular protection against a systemic inflammatory challenge via both Nrf2-dependent and independent pathways. *Vascul Pharmacol.* 85:29-38
- Holmström KM, Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:411-21

- Hong E, Castillo C, Rivero I, Somanathan R (1990) Vasodilator and antihypertensive actions of 3-nitropropionic acid. *Proc West Pharmacol Soc.* 33:209–11
- Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS (2016) Sulforaphane and other nutrigenomic Nrf2 activators: Can the clinician's expectation be matched by the reality? *Oxid Med Cell Longev.* 2016:7857186
- Hu C, Eggler AL, Mesecar AD, van Breemen RB (2011) Modification of Keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol.* 24:515–52
- Hu W (1986) The isolation and structure identification of a toxic substance, 3-nitropropionic acid, produced by *Arthrinium* from mildewed sugarcane. *Chin J Prevent Med* 20:321–33
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem.* 277:42769-74
- Huang LS, Sun G, Cobessi D, Wang AC, Shen JT, Tung EY, Anderson VE, Berry EA (2006) 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *J Biol Chem.* 281: 5965–72
- Hunter DR, Haworth RA (1979) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Arch Biochem Biophys.* 195:468-77
- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257:1492-1502
- Ibañez B, Heusch G, García-Dorado D, Fuster V, Yellon D (2017). En V. Fuster, R. A. Harrington, & N. JEZ (Eds.), *Molecular and cellular mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury* (14th ed.). New York, NY: McGraw-Hill.
- Iliodromitis EK, Cohen MV, Dargatzis N, Andreadou I, Kremastinos DT, Downey JM (2015) What is wrong with cardiac conditioning? We may be shooting at moving targets. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 20:357-69
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M (2003) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8:379-81
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 320:61-7
- Jackson SJ, Singletary KW (2004) Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J Nutr.* 134:2229-36
- Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem.* 285:22576-91
- James LF, Hartley WJ, Williams MC, Van Kampen KR (1980) Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitro-bearing *Astragalus* or their toxins. *Am J Vet Res* 41:377–82
- Jang S, Lewis TS, Powers C, Khuchua Z, Baines CP, Wipf P, and Javadov S (2017) Elucidating mitochondrial electron transport chain supercomplexes in the heart during ischemia-reperfusion. *Antioxid Redox Signal* 27:57-69
- Johri A, Beal MF (2012) Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822:664-74
- Jones DP (2015) Redox theory of aging. *Redox Biol.* 5:71–79
- Jong WM, Ten Cate H, Linnenbank AC, de Boer OJ, Reitsma PH, de Winter RJ, Zuurbiel CJ (2016) Reduced acute myocardial ischemia-reperfusion injury in IL-6-deficient mice employing a closed-chest model. *Inflamm Res.* 65:489-99

- Joviano-Santos JV, Santos-Miranda A, Botelho AFM, de Jesus ICG, Andrade JN, de Oliveira Barreto T, Magalhães-Gomes MPS, Valadão PAC, Cruz JDS, Melo MM, Guatimosim S, Guatimosim C (2019) Increases oxidative stress and CaMKII activity contribute to electro-mechanical defects in cardiomyocytes from a murine model of Huntington's disease. *FEBS J.* 286:110-23
- Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen JG, Chen TY, Fahey JW, Talalay P (2013) Keap1-Nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Top Curr Chem.* 329:163-77
- Kerns M, DePianto D, Yamamoto M, Coulombe PA (2010) Differential modulation of keratin expression by sulforaphane occurs via Nrf2-dependent and -independent pathways in skin epithelia. *Mol Biol Cell.* 21:4068-75
- Keum YS, Yu S, Chang PP, Yuan X, Kim JH, Xu C, Han J, Agarwal A, Kong AN (2006) Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* 66:8804-13
- Khan AUH, Allende-Vega N, Gitenay D, Garaude J, Vo DN, Belkhala S, Gerbal-Chaloin S, Gondeau C, Daujat-Chavanieu M, Delettre C, Orecchioni S, Talarico G, Bertolini F, Anel A, Cuezva JM, Enriquez JA, Cartron G, Lecellier CH, Hernandez J, Villalba M (2018) Mitochondrial Complex I activity signals antioxidant response through ERK5. *Sci Rep.* 8:7420
- Kim EN, Lim JH, Kim MY, Ban TH, Jang IA, Yoon HE, Park CW, Chang YS, Choi BS (2018) Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. *Aging (Albany NY).* 10:83-99
- Kiriazis H, Jennings NL, Davern P, Lambert G, Su Y, Pang T, Du X, La Greca L, Head GA, Hannan AJ, Du XJ (2012) Neurocardiac dysregulation and neurogenic arrhythmias in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Physiol.* 590:5845-60
- Klepac N, Relja M, Klepac R, Hecimovic S, Babic T, Trkulja V (2007) Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects: a cross-sectional study. *J Neurol.* 254:1676-83
- Kobal J, Cankar K, Pretnar J, Zaletel M, Kobal L, Teran N, Melik Z (2017) Functional impairment of precerebral arteries in Huntington's diseases. *J Neurol Sci.* 372:363-68
- Kobal J, Melik Z, Cankar K, Bakrovic FF, Meglic B, Peterlin B, Zaletel M (2010) Autonomic dysfunction in pre-symptomatic and early symptomatic Huntington's disease. *Acta Neurol Scand.* 121:392-99
- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 12:213-23
- Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, Mandlekar S (2001) Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev.* 33:255-71
- Kumar RR, Narasimhan M, Shanmugam G, Hong J, Devarajan A, Palaniappan S, Zhang J, Halade GV, Darley-Usmar VM, Hoidal JR, Rajasekaran NS (2016) Abrogation of Nrf2 impairs antioxidant signaling and promotes atrial hypertrophy in response to high-intensity exercise stress. *J Transl Med.* 14:86
- Königsberg M (2013) Radicales libres y estrés oxidante. En Laguna, José (ed). *Bioquímica de Laguna: Con apoyo electrónico* (p.p. 1-16) México, Editorial: El Manual Moderno

- Lamark T, Svenning S, Johansen T (2017) Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* 61:609-24
- Lanska DJ, Lavine L, Lanska MJ, Schoenberg BS (1998) Huntington's disease mortality in the United States. *Neurology* 38:769-772
- Lee WT, Chang C (2004) Magnetic resonance imaging and spectroscopy in assessing 3-nitropropionic acid-induced brain lesions: an animal model of Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 72:87-110
- Lee Y, Shin DH, Kim JH, Hong S, Choi D, Kim YJ, Kwak MK, Jung Y (2010) Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and IkappaB kinase inhibition are involved in NFkappaB inhibitory effect: structural analysis for NFkappaB inhibition. *Eur J Pharmacol* 643:21-8
- Leoncini E, Malaguti M, Angeloni C, Motori E, Fabbri D, Hrelia S (2011) Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway. *J Food Sci.* 76:H175-81
- Lewis KN, Mele J, Hayes JD, Buffenstein R (2010) Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr Comp Biol.* 50:829-43
- Li JY, Popovic N, Brundin P (2005) The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx.* 2:447-64
- Lida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H, Yamamoto M (2004) Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 64:6424-31
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 13:757-772
- Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM (2007) Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* 75:530-5.
- Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* 16:899-909
- Liu XJ (1986) Investigations on the etiology of mildewed sugarcane poisoning. A review. *Chin J Prevent Med* 20:306-8
- Lopez PS, Castillo CH, Pastelín GH, Hernández MR, Suárez MJ, Sánchez ML, Escalante BA (1998) Characterization of 3-nitropropionic acid-induced bradycardia in isolated atria. *Toxicol Appl Pharmacol.* 148:1-6
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-75
- Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830:143-53
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M (1991) 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci.* 18:492-8
- Luna-López, A, Triana-Martínez F, López-Díazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A, Gómez-Quiroz LE, Königsberg M (2010) Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 49:1192-1204

- Luongo TS, Lambert JP, Gross P, Nwokedi M, Lombardi AA, Shanmughapriya S, Carpenter AC, Kolmetzky D, Gao E, van Berlo JH, Tsai EJ, Molkentin JD, Chen X, Madesh M, Houser SR, Elrod JW (2017) The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *Nature*. 545:93-97
- Lushchak VI (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012:736837
- Ma S, Wang Y, Chen Y, Cao F. (2015) The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta*. 1852:271-6
- Maack C, O'Rourke B (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol*. 102:369-92
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A (2004) Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical, carnosol. *J Biol Chem*. 279:8919-8929
- Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J (2007) Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: Roles of amp-activated protein kinase and beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*. 100:914-22
- Mattson MP (2008) Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways. *Hum. Exp. Toxicol*. 27:155–62
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2000) Keap1-dependent proteosomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*. 278:21592-600
- Mehan S, Parveen S, Kaur G, Kukkar U, Dudi R, Rajput M, Kalra S (2017) Targeting phytochemical driver in AC/cAMP/PKA/CREB activation: the next frontier for alleviating Huntington's type neurodegenerative disorders in 3-NP animal model: a complete review. *EC Neurol*. 6:77–131
- Melik Z, Kobal J, Cankar K, Struel M (2012) Microcirculation response to local cooling in patients with Huntington's disease. *J Neurol*. 259:921-28
- Melkani GC, Trujillo AS, Ramos R, Bodmer R, Bernstein SI, Ocorr K (2013) Huntington's diseases induced cardiac amyloidosis is reversed by modulating protein folding and oxidative stress pathways in the *Drosophila* heart. *PLoS Genet*. 9:e1004024
- Menalled LB, Chesselet MF (2002) Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 23:32-9
- Menegon S, Columbano A, Giordano S (2016) The dual roles of NRF2 in cancer. *Trends Mol Med*. 22:578-93
- Meng J, Lv Z, Qiao X, Li X, Li Y, Zhang Y, Chen C (2017) The decay of redox-stress response capacity is a substantive characteristic of aging: revising the redox theory of aging. *Redox Biol*. 11, 365–74
- Meredith MJ, Reed DJ (1982) Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem*. 257:3747-53
- Mielcarek M (2015) Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis*. 3:e1058464
- Mielcarek M, Inubaso L, Bondulich MK, Muller TT, Osborne GF, Franklin SA, Smith DL, Neueder A, Rosinski J, Rattray I, Protti A, Bates GP (2014b) Dysfunction of the CNS-heart axis in mouse models of Huntington's disease. *PLoS Genet*. 10:e1004450
- Mielcarek M, Rattray I, Osborne GF, Jolinon N, Dick JRT, Bondulich MK, Franklin SA, Ahmed M, Benjamin AC, Goodwin D, Lazell H, Chang X, Lehar A, Wood T, Munoz-Sanjuan I, Howland D, Smith DL, Lee SJ, Greens-

- mith L, Bates GP (2014a) Myostatin inhibition as a novel approach to targeting muscle pathology in HD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:A97
- Miller AF (2001) Fe superoxide dismutase. In: Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghart K, editors. *Handbook of Metalloproteins*. Chichester: John Wiley & Sons; 688-82
- Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF (2010) 3-Nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res*. 88:630–39
- Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME (2018) Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 63:68-78.
- Mittler R (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci*. 22:11-19
- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 147:728-41
- Moffitt H, McPhail GD, Woodman B, Hobbs C, Bates GP (2009) Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*. 4:e8025
- Morciano G, Bonora M, Campo G, Aquila G, Rizzo P, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P (2017) Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol* 982:169-89.
- Moris D, Spartalis M, Tzatzaki E, Spartalis E, Karachaliou GS, Triantafyllis AS, Karaolani GI, Tsilimigras DI, Theocharis S (2017) The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann Transl Med*. 5:324
- Mukherjee S, Lekli I, Ray D, Gangopadhyay H, Raychaudhuri U, Das DK (2010) Comparison of the protective effects of steamed and cooked broccolis on ischaemia-reperfusion-induced cardiac injury. *Br J Nutr*. 103:815-23
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124–36
- Myzak M C, Dashwood RH (2006) Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett*. 233:208–18
- Negi G, Kumar A, Sharma SS (2011) Nrf2 and NF-κB modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes. *Curr Neurovasc Res*. 8:294-304
- Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Vega MI, León-Contreras JC, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Rodríguez E, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2017) Sulforaphane induces differential modulation of mitochondrial biogenesis and dynamics in normal cells and tumor cells. *Food Chem Toxicol*. 100:90-102
- Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB (2003) Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. *J Biol Chem*. 278:4536-41
- Nguyen T, Yang CS, Pickett CB (2004) The pathways and molecular mechanisms regulation Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med*. 37:433-41
- O'Connell MA, Hayes JD (2015) The Keap1/Nrf2 pathway in health and disease: from the bench to the clinic. *Biochem Soc Trans*. 43:687-9
- O'Mealey GB, Berry WL, Plafker SM (2017) Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. *Redox Biol*. 11:103-110
- Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ (2015) Role of the MPTP in conditioning the heart—translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*. 172:2074–84

- Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ (2018) Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther.* 186:73-87
- Orozco-Ibarra M, García-Morales J, Calvo-Silva FJ, Fernández-Valverde F, Serrano-García N (2016) Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr. Neurosci.* 28:1–11
- Pajares M, Rojo AI, Arias E, Díaz-Carretero A, Cuervo AM, Cuadrado A (2018) Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy.* 14:1310-22
- Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira, II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature cell biology* 15:1464-72
- Pan Y, Schroeder EA, Ocampo A, Barrientos A, Shadel GS (2011) Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptative mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab.*13:668–78
- Pandey M, Varghese M, Sindhu KM, Sreetama S, Navneet AK, Mohanakumar KP, Usha R (2008) Mitochondrial NAD<sup>+</sup>-linked state 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 104:420–34
- Pang Z, Geddes JW (1997) Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci.* 17:3064-73
- Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2014) Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 1837:408-17
- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2018) Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia/reperfusion injury: Implications for pharmacological cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 315:H1341-52
- Parks RJ, Menazza S, Holmström KM, Amanakis G, Fergusson M, Ma H, Aponte AM, Bernardi P, Finkel T, Murphy E (2018) Cyclophilin D-mediated regulation of the permeability transition pore is altered in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Cardiovasc Res.* 115:385-94
- Pattison JS, Sanbe A, Maloyan A, Osinka H, Kleivitsky R, Robbins J (2008) Cardiomyocyte expression of a polyglutamine preamyloid oligomer causes heart failure. *Circulation.* 117:2743-51
- Pavón N, Aranda A, Garcia L, Chávez E (2009) In hyperthyroid rats octylguanidine protects hearts from reperfusion damage. *Endocrine* 35:159-65
- Pell VR, Spiroski AM, Mulvey J, Burger N, Costa ASH, Logan A, Gruszczuk AV, Rosa T, James AM, Frezza C, Murphy MP, Krieg T (2018) Ischemic preconditioning protects against cardiac ischemia reperfusion injury without affecting succinate accumulation or oxidation. *J Mol Cell Cardiol.* 123:88-91
- Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P (2009) Cardioprotection: a radical view. *Free radicals in pre and post-conditioning.* *Biochim Biophys Acta* 1787:781–93
- Persky AM, Green PS, Stublely L, Howell CO, Zaulyanov L, Brazeau GA, Simpkins JW (2000) Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223:59–66
- Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA (2006) A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg.* 244:921-8

- Phan J, Hickey MA, Zhang P, Chesselet MF, Reue K (2009) Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease mouse models. *Hum Mol Genet.* 18:1006–16
- Piao CS, Gao S, Lee GH, Kim DS, Park BH, Chae SW, Chae HJ, Kim SH (2010) Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels. *Pharmacol Res.* 61:342-8
- Pinchuk I, Schnitzer E, Lichtenberg D (1998) Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta.* 1389:155-72
- Piotrowska I, Isalan M, Mielcarek M (2017) Early transcriptional alteration of histone deacetylases in a murine model of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *PLoS One* 12:e0180571
- Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y (2006) The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovasc Res.* 70:170-3
- Pisoschi AM, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem.* 97:55–74
- Przyklenk K, Dong Y, Undyala VV, Whittaker P (2012) Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc Res.* 94:197-205
- Pérez-Rojas JM, Guerrero-Beltrán CE, Cruz C, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Pedraza-Chaverri J (2011) Preventive effect of tert-butylhydroquinone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 49:2631-7
- Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A (2009a) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta.* 1790:1005–14
- Pérez, VI, Buffenstein R, Masamsetti V, Leonard S, Salmon AB, Mele J, Andziak B, Yang T, Edrey Y, Friguet B, Ward W, Richardson A, Chaudhuri A (2009b). Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 106:3059–64
- Qin Q, Qu C, Niu T, Zang H, Qi L, Lyu L, Wang X, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Janicki JS, Wang XL, Cui T (2016) Nrf2-mediated cardiac maladaptive remodeling and dysfunction in a setting of autophagy insufficiency. *Hypertension.* 67:107-17
- Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD (2012) Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 287:27255-64
- Ramírez-Camacho I, Correa F, El Hafidi M, Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Esparza-Perusquía M, Olvera-Sánchez S, Flores-Herrera O, Zazueta C (2018) Cardioprotective strategies preserve the stability of respiratory chain supercomplexes and reduce oxidative stress in reperfused ischemic hearts. *Free Radic Biol Med.* 129:407-17
- Rana A, Goyal N, Ahlawat A, Jamwal S, Reddy B, Sharma S (2015) Mechanisms involved in attenuated cardioprotective role of ischemic preconditioning in metabolic disorders. *Perfusion.* 30:94–105
- Rasmussen TP, Wu Y, Joiner ML, Koval OM, Wilson NR, Luczak ED, Wang Q, Chen B, Gao Z, Zhu Z, Wagner BA, Soto J, McCormick ML, Kutschke W, Weiss RM, Yu L, Boudreau RL, Abel ED, Zhan F, Spitz DR, Buettner GR, Song LS, Zingman LV, Anderson ME (2015) Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:9129-9134.
- Reczek CR, Chandel NS (2015) ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 33:8-13

- Reffellmann T, Kloner RA (2006) The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 101:359-72
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:8665-70
- Rodrigo R, Hasson D, Prieto JC, Dussaillant G, Ramos C, León L, Gárate J, Valls N, Gormaz JG (2014) The effectiveness of antioxidants vitamins C and E in reducing myocardial infarct size in patients subjected to percutaneous coronary angioplasty (PREVEC trial): study protocol for a pilot randomized double-blind controlled trial. *Trials.* 15:192
- Rodriguez KA, Wywial E, Perez VI, Lambert AJ, Edrey YH, Lewis KN, Lindsey ML, Brand MD, Buffenstein R (2011) Walking the oxidative stress tightrope: a perspective from the naked mole-rat, the longest-living rodent. *Curr Pharm Des.* 17:2290–2307
- Rosenberg JH, Werner JH, Moulton MJ, Agrawal DK (2018) Current modalities and mechanisms underlying cardioprotection by ischemic conditioning. *J Cardiovasc Transl Res.* 11:292-307
- Rossello X, Yellon DM (2017) The RISK pathway and beyond. *Basic Res Cardiol.* 113:2
- Sabri MI, Spencer PS, Baggia S, Ludolph AC (2000) Clinical manifestations and mechanisms of action of environmental mitochondrial toxins. In: Sanberg PR, Nishino H, Borlongan CV (eds) *Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders.* Contemporary Neuroscience. Humana Press, Totowa, NJ
- Saeidnia S, Abdollahi M (2013) Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol Appl Pharmacol.* 271:49-63
- Safdar A, deBeer J, Tarnopolsky MA (2010) Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old. *Free Radic Biol Med.* 49:1487–93
- Salmon AB, Richardson A, Pérez VI (2010) Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic Biol Med.* 48:642–55
- Santos AL, Sinha S, Lindner AB (2018) The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New insights on aging and aging-related diseases from eukaryotic and prokaryotic model organisms. *Oxid Med Cell Longev.* 2018:1941285
- Santín-Márquez R, Alarcón-Aguilar A, López-Diazguerrero NE, Chondrogianni N, Königsberg M (2019) Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration. *Geroscience.* doi: 10.1007/s11357-019-00061-7.
- Sassone J, Colciago C, Cislighi G, Silani V, Ciammola A (2009) Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues. *Exp Neurol.* 219:385–39
- Satoh H, Moriguchi T, Taguchi K, Takai J, Maher JM, Suzuki T, Winnard PT Jr, Raman V, Ebina M, Nukiwa T, Yamamoto M (2010) Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis.* 31:1833-43
- Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 24:R453-62
- Schroeder AM, Wang HB, Park S, Jordan MC, Gao F, Coppola G, Fishbein MC, Roos KP, Ghiani CA, Colwell CS (2016) Cardiac dysfunction in the BACHD mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 11:e0147269
- Schulman D, Latchman DS, Yellon DM (2002) Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H1481-8
- Schöming A, Mehilli J, Antonucci D, Ndrepepa G, Markwardt C, Di Pede F, Nekolla SG, Schlotterbeck K, Schühlen H, Pache J, Seyfarth M, Martinoff S, Benzer W, Schmitt C, Dirschinger J, Schwaiger M, Kastrati A; Beyond

- 12 hours Reperfusion Alternative Evaluation (BRAVE-2) Trial Investigators (2005) Mechanical reperfusion in patients with acute myocardial infarction presenting more than 12 hours from symptom onset: a randomized controlled trial. *JAMA*. 293:2865-72
- Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA (2018) Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol*. 150:5-12
- Shadel GS, Horvath TL (2015) Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*. 163:560-9
- Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*. 20:21-30
- Shan Y, Wang X, Wang W, He C, Bao Y (2010) p38 MAPK plays a distinct role in sulforaphane-induced up-regulation of ARE-dependent enzymes and down-regulation of COX-2 in human bladder cancer cells. *Oncol Rep*. 23:1133-38
- Silva-Islas CA, Maldonado PD (2018) Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res*. 134:92-99
- Silva-Palacios A, Colín-González AL, López-Cervantes SP, Zazueta C, Luna-López A, Santamaría A, Königsberg M (2017) Tert-butylhydroquinone pre-conditioning exerts dual effects in old female rats exposed to 3-nitropropionic acid. *Redox Biol*. 12:610-24
- Silva-Palacios A, Königsberg M, Zazueta C (2016) Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases? *Ageing Res Rev*. 26:81-95
- Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Zazueta C, Königsberg M (2018) Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing Res Rev*. 47:31-40
- Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, Neri LM (2018) Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*. 9:17181-98
- Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation*. 112:2143-8
- Stavrovskaya AV, Voronkov DN, Yamshchikova NG, Ol'shanski AS, Khudoerko RM, Illarioshkin SN (2016) Experience of experimental modelling of Huntington's disease. *Hum. Physiol*. 42:898-904
- Stein AB, Tiwari S, Thomas P, Hunt G, Levent C, Stoddard MF, Tang XL, Bolli R, Dawn B (2007) Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. *Basic Res Cardiol*. 102:28-41
- Stephen C, Hersch S, Rosas H (2015) Huntington's disease and the heart: electrocardiogram abnormalities suggest cardiac involvement. *Neurology* 84:P5.294
- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 278:2396-2402
- Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG (2005) Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J. Neurochem*. 93:611-23
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and non-neural tissues. *Nat Genet*. 5:259-65
- Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*. 101:3381-86

- Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M (2008) Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*. 117:1037-44
- Toczek M, Kutryb-Zajac B, Zukowska P, Slominska EM, Isalan M, Mielcarek M, Smolenski RT (2016a) Changes in cardiac nucleotide metabolism in Huntington's disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 35:707-12
- Toczek M, Zielonka D, Zukowska P, Marcinkowski JT, Slominska E, Isalan M, Smolenski RT, Mielcarek M (2016b) An impaired metabolism of nucleotides underpins a novel mechanism of cardiac remodeling leading to Huntington's disease related cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1862:2147–57
- Toldo S, Mauro AG, Cutter ZS, Abbate A (2018) Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 315:H1553-68
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 10:1343-74
- Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A (2010) 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules*. 15:878-916
- Valls-Lacalle L, Barba I, Miró-Casas E, Albuquerque-Béjar JJ, Ruiz-Meana M, Fuertes-Agudo M, Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D (2016) Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 109:374-84
- van der Burg JM, Björkqvist M, Brundin P (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol*. 8:765–74
- van Raamsdonk JM (2015) Levels and location are crucial in determining the effect of ROS on lifespan. *Worm*. 4:e1094607
- van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A (2003) Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 16:29–37
- Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2019) Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *J Med Food*. 22:121-26
- Verhagen H, Furnee C, Schutte B, Hermans RJ, Bosman FT, Blijham GH, ten Hoor F, Henderson PT, Kleinjans JC (1989) Butylated hydroxyanisole-induced alterations in cell kinetic parameters in rat forestomach in relation to its oxidative cytochrome P-450-mediated metabolism. *Carcinogenesis* 10:1947–51
- Vidoni C, Castiglioni A, Seca C, Secomandi E, Melone MA, Isidoro C (2016) Dopamine exacerbates mutant Huntingtin toxicity via oxidative-mediated inhibition of autophagy in SH-SY5Y neuroblastoma cells: beneficial effects of anti-oxidant therapeutics. *Neurochem Int* 101:132–43
- Vinten-Johansen J (2004) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 61:481-97
- Wang A, Zhang H, Liang Z, Xu K, Qiu W, Tian Y, Guo H, Jia J, Xing E, Chen R, Xiang Z, Liu J (2016) U0126 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and autophagy in myocardium through MEK/ERK/EGR-1 pathway. *Eur J Pharmacol*. 788:280-85
- Wang S, Wang C, Yan F, Wang T, He Y, Li H, Xia Z, Zhang Z (2017) N-Acetylcysteine Attenuates Diabetic Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Inhibiting Excessive Autophagy. *Mediators Inflamm*. 2017:925729

- Wang S, Zhu Y, Qiu R (2018) Shikonin protects H9C2 cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through activation of PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 104:712-17
- Wang XJ, Hayes JD, Higgins LG, Wolf CR, Dinkova-Kostova AT (2010) Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem Biol.* 17:75–85
- Wilkinson J 4th, Radjendirane V, Pfeiffer GR, Jaiswal AK, Clapper ML (1998) Disruption of c-Fos leads to increased expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 and glutathione S-transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:855-8
- Wood NI, Sawiak SJ, Buonincontri G, Niu Y, Kane AD, Carpenter TA, Giussani DA, Morton AJ (2012) Direct evidence of progressive cardiac dysfunction in a transgenic mouse model of Huntington's diseases. *J Huntingtons Dis.* 1:57-64
- Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY (2013) Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry.* 46:200–6
- Wu S, Chang G, Gao L, Jiang D, Wang L, Li G, Luo X, Qin S, Guo X, Zhang D (2018) Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy. *J Mol Med (Berl).* 96:791-806
- Xiao J, Zhu X, He B, Zhang Y, Kang B, Wang Z, Ni X (2011) MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *J Biomed Sci.* 18:35
- Xin Y, Bai Y, Jiang X, Zhou S, Wang Y, Wintergerst KA, Cui T, Ji H, Tan Y, Cai L (2018) Sulforaphane prevents angiotensin II-induced cardiomyopathy by activation of Nrf2 via stimulating the Akt/GSK-3 $\beta$ /Fyn pathway. *Redox Biol.* 15:405-417
- Xuan F, Jian J (2016) Epigallocatechin gallate exerts protective effects against myocardial ischemia/reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis and the restoration of the autophagic flux. *Int J Mol Med.* 38:328-36
- Yang L, Palliyaguru DL, Kensler TW (2016) Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. *Semin Oncol.* 43:146-53
- Yasui K, Baba A (2006) Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res.* 55: 359-63
- Yellon DM, Hausenloy DJ (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 357:1121-35
- Younus H (2018) Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)* 12: 88-93
- Yu JS, Chen WC, Tseng CK, Lin CK, Hsu YC, Chen YH, Lee JC (2016) Sulforaphane suppresses hepatitis C virus replication by up-regulating heme oxygenase-1 expression through PI3K/Nrf2 pathway. *PLoS One.* 11:e0152236
- Yu R, Chen, C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, Kong AN (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism, *J Biol Chem* 275:39907–13
- Zeng Y, Yang X, Wang J, Fan J, Kong, Q, Yu X (2012) Aristolochic acid I induced autophagy extenuates cell apoptosis via ERK 1/2 pathway in renal tubular epithelial cells. *PloS One.* 7:e30312
- Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S, Esopi D, Kombairaju P, Bodas M, Wu H, Bova SG, Biswal S (2010) Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 9:336-46

- Zhang T, Zhang Y, Cui M, Jin L, Wang Y, Lv F, Liu Y, Zheng W, Shang H, Zhang J, Zhang M, Wu H, Guo J, Zhang X, Hu X, Cao CM, Xiao RP (2016) CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nature medicine* 22:175-82.
- Zhang X, Xiao Z, Yao J, Zhao G, Fa X, Niu J (2013) Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart. *Mol Cell Biochem.* 372:169-79
- Zhang Z, Wang S, Zhou S, Yan X, Wang Y, Chen J, Mellen N, Kong M, Gu J, Tan Y, Zheng Y, Cai L (2014) Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 77:42-52
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H579–88.
- Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000). Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research* 45:651–60.
- Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2001). Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* 6:279–90
- Zhu X, Zuo L (2013) Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia. *Cell Death Dis.* 4:e787
- Zielonka D, Piotrowska I, Mielcarek M (2014) Cardiac dysfunction in Huntington's disease. *Exp Clin Cardiol.* 20:2547-54
- Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM (2015) Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol (Oxf).* 214:329-48
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1404-7

## XVI. Publicaciones derivadas de esta tesis

- a. Silva-Palacios A, Königsberg M, Zazueta C (2016) Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases? *Ageing Res Rev* 26:81-95
- b. Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarria M, Buelna-Chontal M, Garibay C, Hernández-Reséndiz S, Rol-dán FJ, Flores PL, Luna-López A, Königsberg M, Zazueta C (2017) 3-NP-induced Huntington's-like diseases impairs Nrf2 activation without loss of cardiac function in aged rats. *Exp Gerontol.* 96:89-98
- c. Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarria M, Zazueta C, Königsberg M (2018) Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing Res Rev* 47:31-40



## 3-NP-induced Huntington's-like disease impairs Nrf2 activation without loss of cardiac function in aged rats



A. Silva-Palacios<sup>a,b,g</sup>, M. Ostolga-Chavarría<sup>a</sup>, M. Buelna-Chontal<sup>a</sup>, C. Garibay<sup>c</sup>, S. Hernández-Reséndiz<sup>a</sup>, F.J. Roldán<sup>d</sup>, P.L. Flores<sup>e</sup>, A. Luna-López<sup>f</sup>, M. Königsberg<sup>b</sup>, C. Zazueta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Ecocardiografía, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico

<sup>e</sup> Departamento de Instrumentación Electromecánica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico

<sup>f</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Instituto Nacional de Geriátrica, Mexico

<sup>g</sup> Programa de Posgrado en Biología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 May 2017

Received in revised form 12 June 2017

Accepted 13 June 2017

Available online 15 June 2017

#### Keywords:

Aging

Nrf2 signaling

3-Nitropropionic acid

Cardiac function

Hormesis

### ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are one of the leading causes of death in patients over 60 years with Huntington's disease (HD). Here, we investigated if age-related oxidative stress (OS) is a relevant factor to develop cardiac damage in an *in vivo* model of striatal neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid (3-NP). We also evaluated the potential effect of tert-butylhydroquinone (tBHQ) to increase the Nrf2-regulated antioxidant response in hearts from adult and aged rats intoxicated with 3-NP. Our results showed that 3-NP-treatment did not induce cardiac dysfunction, neither in adult nor in aged rats. However, at the cellular level, adult animals showed higher susceptibility to 3-NP-induced damage than aged rats, which suggest that chronic oxidative stress ongoing during aging might have induced an hormetic response that probably prevented from further 3-NP damage. We also found that the oxidative imbalance concurs with unresponsiveness of the Nrf2-mediated antioxidant response in old animals.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Current statistics indicate that about 20% of older adults suffer from a neurologic disorder, which means that 400 million people might be potentially affected by neurological diseases in a near future. Huntington's disease (HD) is an inherited genetic disease that occurs in younger patients, but that still shares many features of common neurological diseases prevailing in elderly individuals. It causes loss of medium spiny neurons in the striatal nuclei due to a mutation in the huntingtin gene (Menze et al., 2016). Cognitive and behavioral abnormalities are often accompanied by cardiac dysfunction. In fact, epidemiological studies indicate that cardiovascular diseases prevail in HD patients (Sorensen and Fenger, 1992; Wu et al., 2016) standing for the second-leading mortality cause in HD patients over 60-years old (Lanska et al., 1998; Zielonka et al., 2014; Mielcarek et al., 2014a).

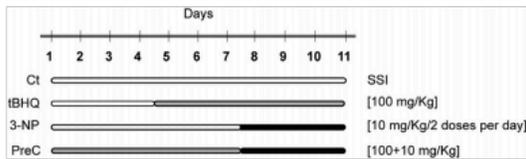
HD transgenic models concur with cardiac dysfunction (Kiriazis et al., 2012; Wood et al., 2012), remodeling processes (Mielcarek et al.,

2014a), heart failure (Mihm et al., 2007), diminished hypertrophic response (Mielcarek et al., 2014b), impaired energy imbalance and nucleotide metabolism (Toczek et al., 2016a; Toczek et al., 2016b). Moreover, 3-nitropropionic acid (3-NP) systemic administration, an accepted model that mimics HD symptoms and neuropathology (Hariharan et al., 2014), has been related with histological, biochemical and ultrastructural changes in mice muscle (Gabrielson et al., 2001; Hernández-Echeagaray et al., 2011), along with decrement in blood pressure, bradycardia and ATP diminution in heart atria (Castillo et al., 1993). 3-NP also induces the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) (Mirandola et al., 2010) and inhibits oxygen consumption in isolated cardiac mitochondria (Lopez et al., 1998). It is accepted that 3-NP-induced neurodegeneration relies on the irreversible inhibition of mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) producing an energetic deficit, excitotoxicity and oxidative stress (Liot et al., 2009; Cho and Kim, 2015).

One of the most relevant players in maintaining redox cellular homeostasis is the transcription factor Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), which is activated either by reactive oxygen species (ROS), electrophilic agents (e.g., dimethylfumarates, aldo-keto reductases, oltipraz) or natural compounds (e.g., curcumin, sulforaphane) (Abed et al., 2015; Lu et al., 2016; Penning, 2017). Age-dependent decline in the antioxidant

\* Corresponding author at: Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico.

E-mail address: [ana.zazueta@cardiologia.org.mx](mailto:ana.zazueta@cardiologia.org.mx) (C. Zazueta).



**Fig. 1.** Scheme of treatments administered to adults and older animals. Ct: Control group; ISS: isotonic saline solution.

response has been related with reduced nuclear translocation and/or Nrf2 stability loss (Safdar et al., 2010; Miller et al., 2012; Silva-Palacios et al., 2016). However, some reports have shown that several interventions such as exercise training (Gounder et al., 2012),  $\alpha$ -lipoic acid (Suh et al., 2004) and tert-butylhydroquinone (tBHQ) treatments (Alarcón-Aguilar et al., 2014) restored Nrf2 nuclear levels or protected cells from further damage (Silva-Palacios et al., 2017) in different models.

Consequently, since cardiac complications associated to HD have not been explored during aging, and neither if attenuation of oxidative stress might be a possible mechanism for cytoprotection, in this work we evaluated if heart dysfunction coexists with 3-NP-induced neurodegeneration and, if the nuclear factor Nrf2 could be pharmacologically activated by tBHQ in old rats.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and ethical approval

Adult (9 months-old) and old (24 months-old) albino Wistar female rats (*Rattus norvegicus*), provided by the closed breeding colonies at the National Institute of Cardiology, Ignacio Chavez and Autonomous Metropolitan University-Iztapalapa were used in this study. A total of 39 adult and 36 old rats were employed. The animals were kept in acrylic boxes under standard conditions of room temperature ( $25 \pm 3$  °C) and 12 h light:12 h dark cycles. They were housed 3-per-cage in acrylic boxes and provided with standard commercial rat diet (Rodent Chow; Purina, St. Louis, MO) and water *ad libitum*. All animals were handled according to the criteria established by the standard of "Care and Use of Laboratory Animals" published by the United States National Institutes of Health (US-NIH, NIH publication 85–23, 1985) and approved by the Ethics Committee of the National Institute of Cardiology, Ignacio Chavez. The experimental protocols followed the guidelines of Official Mexican Standard for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and for disposal of biological residues (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

### 2.2. Reagents

Tert-butylhydroquinone (tBHQ), 3-nitropropionic acid (3-NP) and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (San Luis, MO).

The compounds were dissolved in isotonic saline solution (ISS) for subsequent injection. Chemiluminescent detection system and Oxiblot™ kit were obtained from Millipore (Bedford, MA). The kits used for electrophoretic mobility assay (EMSA) and for nuclear protein extraction were purchased from Thermo Scientific (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

### 2.3. Antibodies

All primary antibodies were obtained from commercial sources and used according to the manufacturer's recommendations. Anti-Nrf2 (sc-722), anti-GST (sc-138), anti- $\gamma$ -GCS (sc-22755), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, sc-47724) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-HO-1 (#3391) from BioVision (Milpitas, CA), anti-MMP-2 (#13405) from Millipore (Bedford, MA) and anti-Collagen-III (#26310) from GeneTex (San Antonio, TX). Either anti-GAPDH or anti-actin were used as loading control for cytosolic fractions and lamin A (ab26300, Abcam, Cambridge, MA) for nuclear fractions.

### 2.4. Experimental groups

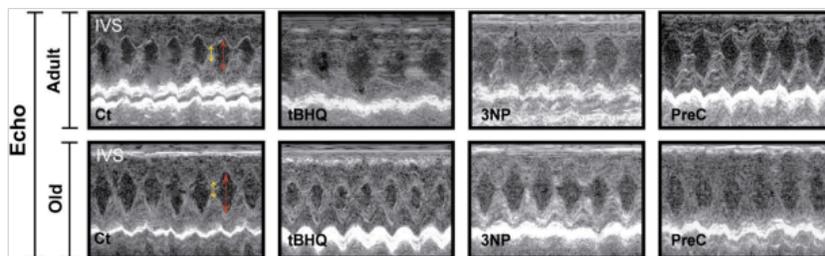
Adult and elderly rats were randomly assigned into 4 experimental groups as shown in Fig. 1 and described below:

1. *Control group*, rats that received only ISS intraperitoneally (i.p.) as vehicle during 11 days.
2. *tBHQ group*, rats received ISS i.p. during 4 days and then tBHQ (100 mg/kg/day) i.p. for 7 days.
3. *3-NP group*, rats received ISS i.p. for 7 days and then 3-NP (10 mg/kg/2 doses per day) i.p. for 4 days.
4. *Preconditioned group (PreC)*, rats treated with tBHQ i.p. for 7 days, followed by 3-NP treatment (10 mg/kg/2 doses per day) i.p. for 4 days.

This particular 3-NP-administration protocol has been associated with striatal degeneration and HD symptoms such as increased reactive gliosis, cell death and hypoactive motor behavior. tBHQ-conditioning as described here has been previously reported to diminishes all those conditions (Silva-Palacios et al., 2017).

### 2.5. Evaluation of cardiac function by echocardiography

Rats from the different groups were anesthetized with a low dose of sodium pentobarbital (1.9 mg/100 g body weight, i.p.) to perform echocardiographic analysis using a Sonos 550 echocardiographer (Koninklijke Philips Electronics, Eindhoven, The Netherlands) using a 12 MHz transducer according to our previous report (Hernández-Reséndiz et al., 2013). Paraesternal short and long axes were analyzed by two-dimensional M-mode echocardiography, evaluating at least 3 pulses in each rat. The cavity and the thickness of the left ventricle (LV) were measured to calculate the ejection fraction (EF) using the formula:



**Fig. 2.** Effect of 3-NP treatment on cardiac function in adult and old animals. Representative echocardiographic images (Echo). IVS, interventricular septum; left ventricular dimension in end-diastole (red arrow); left ventricular dimension in end-systole (yellow arrow). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**

**Structural and functional parameters from adult and old animals.** Data are the mean  $\pm$  SD of at least 3 different animals in each experimental group. The bold numbers indicate  $p < 0.01$  vs. Ct Adult. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. its own Ct.

Parameter	Adult				Old			
	Ct	tBHQ	3NP	PreC	Ct	tBHQ	3NP	PreC
Body weight (g)	247 $\pm$ 8	260 $\pm$ 13	250 $\pm$ 9	242 $\pm$ 19	<b>385 <math>\pm</math> 33</b>	305 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	318 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	341 $\pm$ 48
Heart weight (g)	1 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.1	<b>2 <math>\pm</math> 0.4</b>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
HW/BW (g/kg)	4 $\pm$ 0.4	4 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 1.14	3.6 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.7
Lung weight (g)	2 $\pm$ 0.1	2 $\pm$ 0.3	2 $\pm$ 0.3	2 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.4
LW/BW (g/kg)	9 $\pm$ 1	8 $\pm$ 0.5	7 $\pm$ 1	8.4 $\pm$ 1.8	<b>6.5 <math>\pm</math> 2.9</b>	7 $\pm$ 3.4	5.7 $\pm$ 1.0	5.9 $\pm$ 0.9
IVS (mm)	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.01
LVDD (mm)	5.4 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.06	5.2 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.6
LVSD (mm)	3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.2	<b>2.6 <math>\pm</math> 0.6</b>	1.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 0.5
EF (%)	86 $\pm$ 2	90 $\pm$ 6	86 $\pm$ 3	86 $\pm$ 3	86 $\pm$ 8	94 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4	90 $\pm$ 6
FS (%)	48 $\pm$ 2	59 $\pm$ 2	49 $\pm$ 4	48 $\pm$ 3	<b>53 <math>\pm</math> 10</b>	62 $\pm$ 11	56 $\pm$ 7	54 $\pm$ 8
Heart rate (beats/min)	142 $\pm$ 6	127 $\pm$ 10	136 $\pm$ 2	143 $\pm$ 16	<b>155 <math>\pm</math> 22.8</b>	137 $\pm$ 4.3	131 $\pm$ 18	145 $\pm$ 10.7
Functional parameters	(n = 4)	(n = 4)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 6)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)

$\%EF = Y + [(100 - Y) \cdot 0.15]$ , where  $Y = [LVEDD^2 - LVESD^2 / LVEDD^2] \cdot 100$  as well as the fractional shortening  $\%FS = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \cdot 100$ , where LVEDD is the dimension of the LV at the end of diastole, LVESD is the dimension of LV at the end of systole (Stein et al., 2007). Animals were allowed to recover for some days before euthanization.

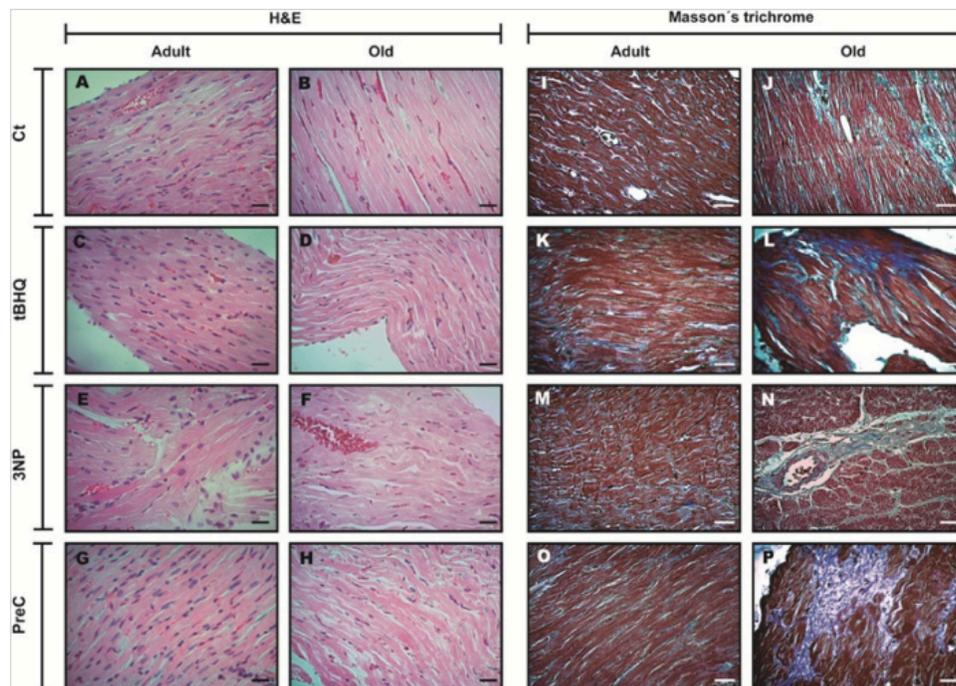
lungs were extracted and weighted. Cardiac tissue was fixed in *p*-formaldehyde 4% for 48 h, embedded in paraffin and serially sectioned on a microtome rotation Leica RM 2125RT (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Cardiac tissue sections (2  $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin-eosin (H&E) or Masson's trichrome. Left ventricles were analyzed using a Carl Zeiss Primo Star Image Analyzer with an integrated Zeiss AxioCam ERc 5S camera (LLC, US).

## 2.6. Histological analysis

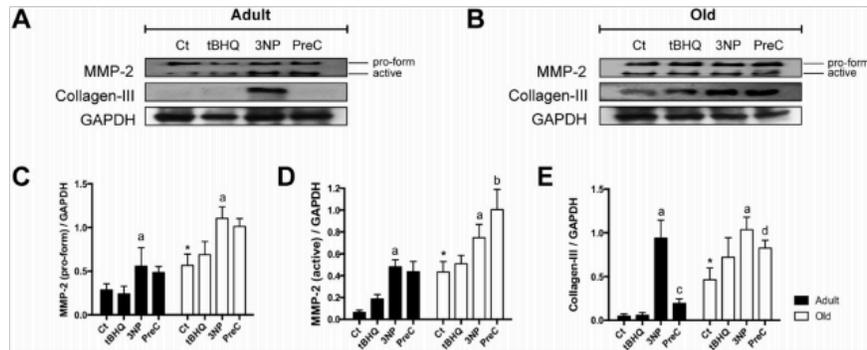
The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (5 mg/100 g body weight, i.p.) and complete lack of pain response was assessed by determining pedal withdrawal reflex. Hearts and

## 2.7. Protein carbonylation assay

Carbonyl groups were detected using the Oxiblot™ Protein Oxidation Detection kit (Millipore, Billerica, MA), according to the manufacturer's



**Fig. 3.** Left ventricular cross-sections stained with H&E and Masson's trichrome. Morphological changes of left ventricle were analyzed by light microscopy (Bars = 40  $\mu$ m) in adult and old animals. Images are representative of at least three independent experiments for each group.



**Fig. 4.** Cardiac remodeling in hearts from adult and old animals. Representative Western blot images of metalloproteinase-2 (MMP-2) and collagen-III content in (A) adult and (B) old animals, normalized with GAPDH. (C) Densitometric analysis of the signal intensity obtained after chemiluminescent detection. The results were obtained from 3 to 4 independent experiments and the data are expressed as mean  $\pm$  SD, <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs. Ct, <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , <sup>d</sup> $p < 0.05$  vs. 3-NP. The asterisks (\*) indicate  $p < 0.001$  vs. Adult Ct.

instructions. Band intensity was digitally quantified using Image Studio Lite Software (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska USA).

### 2.8. Lipid peroxidation assay

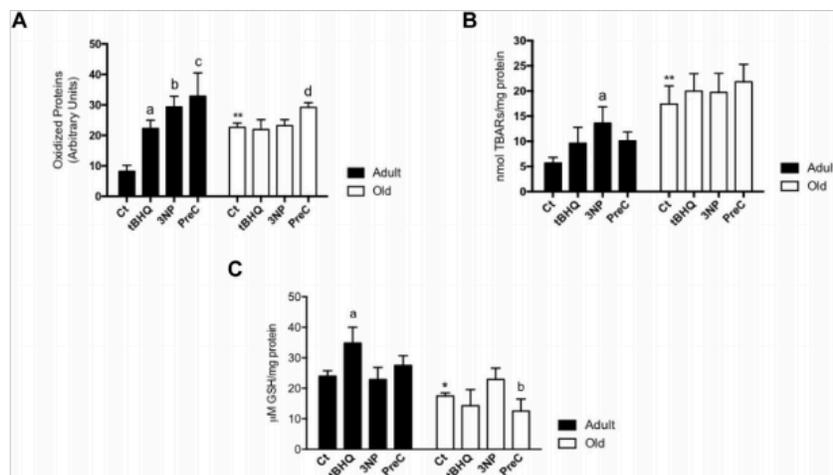
Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analysis was used to evaluate lipid peroxidation in heart homogenates according to Persky et al. (2000) with some modifications. Cardiac tissue homogenates were heated for 20 min at 37 °C before adding 20% of trichloroacetic acid (TCA) in hydrochloric acid (HCl) 1 M. The samples were incubated with 1% thiobarbituric acid (TBA) for 15 min in boiling water (90 °C) and then, placed on ice and centrifuged at 500  $\times$  g for 15 min at 4 °C. The formed MDA · TBA adduct in the supernatant was detected at 532 nm in a Beckman DU-65 Spectrophotometer (Brea, California, USA). MDA concentrations were calculated against a standard curve of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) and results were expressed in TBARS nmol/mg protein. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

### 2.9. Reduced glutathione quantification

Glutathione determination was made according to Buelna-Chontal et al. (2014). In brief, heart homogenates were incubated in a reaction mixture containing Krebs-Henseleit buffer, pH 7.4, 1 mM monochlorobimane (mCB) and glutathione S-transferase (1 U/ml). Changes in fluorescence were measured at  $\lambda_{ex}$  385 nm and  $\lambda_{em}$  478 nm in a Perkin Elmer LS 55 Fluorescence Spectrometer (Waltham, Massachusetts, US) at 37 °C. The obtained values were compared with a GSH standard curve and results were expressed as  $\mu$ M GSH/mg protein. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

### 2.10. Cytosolic and nuclear fractions isolation

Heart tissue (100 mg) was obtained at the end of the experimental protocols. Tissue was frozen and grinded to powder using a mortar and a pestle. Then the pulverized tissue was dissolved in 1 ml of ice cold RIPA lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1%



**Fig. 5.** Markers of oxidative stress damage. (A) Evaluation of oxidized proteins in cardiac tissue homogenates. For adult animals, <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$  vs. Ct. For old animals, <sup>d</sup> $p < 0.05$  vs. Ct. (B) TBARS in cardiac tissue homogenates, <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs. Ct. (C) GSH content. For adult animals <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Ct and for old animals <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. 3-NP. Data represent the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments for each group. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs. Adult Ct.

SDS, 0.5% sodium deoxycholate) and 10  $\mu$ l phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM) (Hernández-Reséndiz et al., 2015), supplemented with protease inhibitor (Complete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) and homogenized using a Dounce homogenizer in cold. Homogenates were centrifuged at 11,000  $\times$ g for 15 min at 4 °C, the supernatant was transferred in a new tube and stored at –70 °C for further analysis. Cytosolic and nuclear fractions were obtained with the NE-PER® kit (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) according to manufacturer's instructions and stored at –70 °C. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

### 2.11. Western blot analysis

Proteins (30–50  $\mu$ g) from each fraction protein were separated on 10–15% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon®-P, Millipore Billerica, MA) and incubated with specific primary antibodies against Nrf2 (1:200), GST (1:200),  $\gamma$ -GCS (1:200), HO-1 (0.5  $\mu$ g/ml), MMP-2 (0.5  $\mu$ g/ml) and Collagen-III (1:1000). The immunoblotted proteins were visualized using a chemiluminescent detection system (Millipore Billerica, MA). Each membrane was incubated with their respective load control (markers of cytosolic and/or nuclear fractions, GAPDH/Actin (1:1000) and lamin-A (1:1000)), respectively. All images were analyzed using an Image Studio Lite Software (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska USA).

### 2.12. Electrophoresis mobility assay (EMSA)

Electrophoresis mobility assay was performed according to Buelna-Chontal et al. (2014). Briefly, biotinylated oligonucleotide containing the antioxidant response element (ARE) sequence (GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT) (Accesolab S.A. de C.V., Mexico City, Mexico) was used as the DNA target. Nuclear proteins (10  $\mu$ g) were incubated in binding reaction buffer containing 50 ng/ $\mu$ l poly (dl · dC), 0.05% Nonidet P-40, 2.5% glycerol, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 M KCl and 20 fmol of Biotin-end-labeled ARE (B-ARE) for 60 min at room temperature. The competition assay was performed by adding an excess of unlabeled ARE for 30 min before the addition of B-ARE. Then, the samples were loaded onto native 5% polyacrylamide gel pre-electrophoresed for 60 min in Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer. The complexes were separated at 100 V and transferred onto a positively charged nylon membrane in TBE at 380 mA for 30 min. Transferred DNA was crosslinked to the membrane and chemiluminescence detection was performed using stabilized streptavidin–horseradish peroxidase conjugate. Nrf2-DNA binding analysis was performed using an Image Studio Lite Software (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska USA).

### 2.13. Statistical analyses

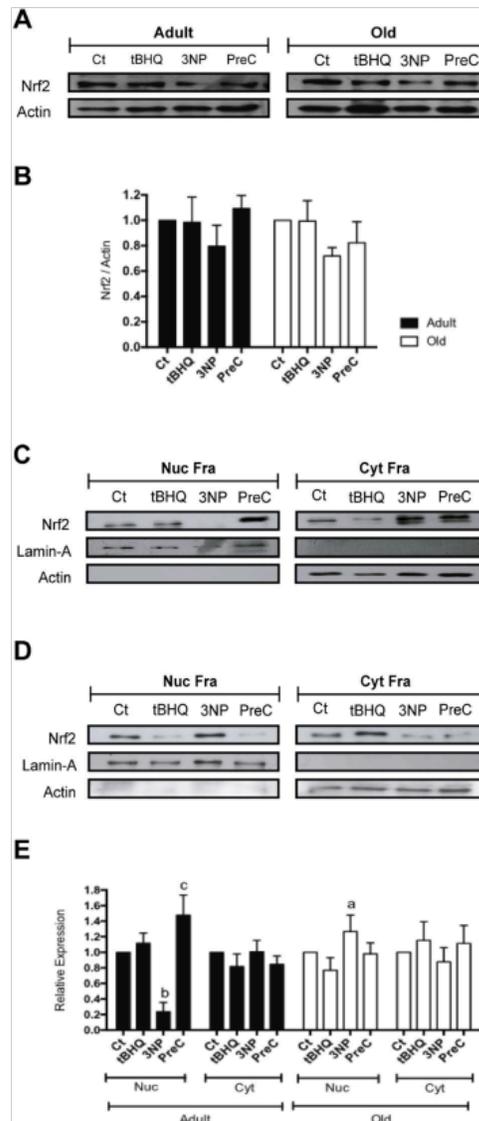
The data represent the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least 3 independent experiments for each of the experimental protocols in triplicate. Significance levels ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) were evaluated through an analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc test for multiple comparisons using the Tukey test (GraphPad Prism version 6.0).

## 3. Results

### 3.1. Cardiac function and structural analysis

Representative echocardiograms from both age groups are shown in Fig. 2. Heart weight (HW), body weight (BW), shortening fraction (SF) and heart rate (HR) increased in control old animals ( $p < 0.01$ ) (Table 1) in comparison with control adult animals; whereas lung weight/body weight (LW/BW) and left ventricle dimension at end-systole (LVSD) decreased in older animals from the control group ( $p < 0.01$ ) as compared to adult animals without any treatment.

Echocardiographic data were similar in all adult animals groups (Table 1). Conversely, 3-NP and tBHQ treatment in old animals diminished BW, HW and LVSD as compared with their own control group ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). Interventricular septum (IVS) thickness and HW decreased in the PreC adult and old animal groups, but none of these



**Fig. 6.** Nrf2 in homogenates, cytosol and nucleus from adult and aged hearts. Western blot images (A) and densitometric analysis (B) of Nrf2 content in total homogenates. Nrf2 content in nuclear (Nuc Fra) and cytosolic fractions (Cyt Fra) from adult animals (C) and from old animals (D). Densitometric analysis of Nrf2 content in Nuc Fra and Cyt Fra from adult and old animals (E). Results represent the mean  $\pm$  SD of 3–4 independent experiments from each group. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. Ct, <sup>c</sup> $p < 0.001$  vs. 3-NP.

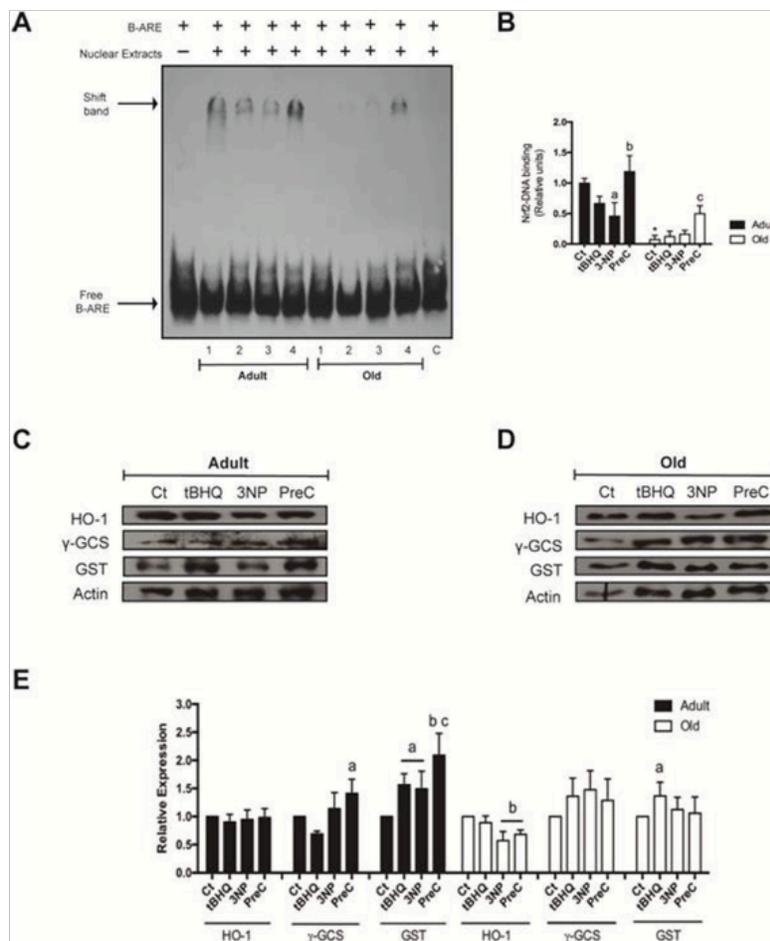
changes were reflected in the ejection fraction (EF), an indicator of cardiac performance.

### 3.2. Cardiac histology

As cells may have thresholds for damage accumulation before function is impaired, we explored the effect of 3-NP between both age groups at a cellular level. Cardiac cells morphological analysis was performed after H&E staining. Adult control group heart sections showed a normal cardiomyocytes architecture with centrally placed nuclei (Fig. 3A), while in the aged control group, cardiac cells were enlarged (Fig. 3B). However, in both groups the fibers organization was preserved. Hearts from adults or old animals supplemented with tBHQ, did not show any visible changes as compared with their own controls (Fig. 3C and D), whereas 3-NP-treatment induced a major myofibrils

disorganization in adult hearts (Fig. 3E), than in old rats hearts (Fig. 3F). Cardiac structure in the adults PreC group was preserved (Fig. 3G), whereas no obvious changes in aged heart were observed (Fig. 3H). Therefore, 3-NP-induced both neurodegeneration and direct toxic effects in the myocardium of old rats, but did not concur with cardiac dysfunction neither in adult nor in aged rats.

The extracellular matrix major components collagens and fibronectin were analyzed with Masson's trichrome staining. Compared with the adult control group (Fig. 3I), older animals showed higher interstitial fibrosis (Fig. 3J). tBHQ treatment induced a slight increase in fibrosis in adult animals (Fig. 3K) and exacerbated fibrosis in aged rats cardiac tissue (Fig. 3L). Perivascular fibrosis was also observed in old animals treated with 3-NP (Fig. 3N). Interestingly, pre-treatment with tBHQ (PreC group) increased fibrosis in old animals (Fig. 3P), but not in the PreC adult group (Fig. 3O), which maintained a similar appearance to their own controls.



**Fig. 7. Nrf2 activation and oxidative response in adult and old animals.** (A) Representative autoradiograph of electrophoretic mobility-shift assay from adult and old hearts. The lanes represent: 1) Control, 2) tBHQ, 3) 3-NP and 4) PreC groups. (B) Image analysis of Nrf2-DNA binding obtained by densitometry. Results represent mean  $\pm$  SD of 3–4 independent experiments in each group. For adult animals  $^*p < 0.05$  vs. Ct,  $^b p < 0.01$  vs. 3-NP and  $^c p < 0.001$  vs. 3-NP for old animals.  $^*p < 0.001$  vs. Adult Ct. The Antioxidant enzymes content in adult (C) and in old (D) animals. (E) Densitometric analysis of antioxidant enzymes levels in adult and old animals. Results represent the mean  $\pm$  SD of 3–4 independent experiments in each group.  $^*p < 0.05$ ,  $^b p < 0.001$  vs. Ct,  $^c p < 0.01$  vs. 3-NP.

### 3.3. Cardiac remodeling

Myocardium extracellular matrix (MEM) damage and loss are important features of cardiac remodeling associated with age. Metalloproteinase-2 (MMP-2) content in its latent (Fig. 4C) and active forms (Fig. 4D) were evaluated in all groups. Active MMP-2 basal levels were higher ( $p < 0.001$ ) in heart tissue from old control rats (Fig. 4B) than in control adult rats (Fig. 4A). The active form increased up to 50% ( $p < 0.001$ ) after 3-NP treatment only in adult hearts, but did not decrease with tBHQ-preconditioning.

Since collagen alterations have been related with MEM changes, collagen-III content was also evaluated. As shown Fig. 4A and B, collagen-III increased ( $p < 0.001$ ) in old control hearts in comparison with control adult hearts, thus corroborating that aging heart undergoes fibrotic remodeling. 3-NP-treatment exacerbated up to 10 times collagen-III content in adult hearts (Fig. 4E,  $p < 0.001$ ), and tBHQ-preconditioning decreased those levels (Fig. 4A,  $p < 0.001$ ). These results correlated with the myofibrils organization changes observed before (Fig. 3E). On the other hand 3-NP-treatment increased collagen-III levels by 60% in older animals compared to their own control; this was partially prevented by tBHQ preconditioning (Fig. 4B and E). These results show that the cardiac response to 3-NP-induced damage and to tBHQ-pretreatment differs among adult and older individuals.

### 3.4. Oxidative stress damage markers

In order to correlate the previous response with oxidative damage, protein and lipid oxidation, along with GSH levels were determined. Fig. 5A shows that 3-NP-treatment augmented oxidized proteins ( $p < 0.01$ ) and lipid peroxidation (Fig. 5B,  $p < 0.001$ ) in hearts from adult rats, but did not exert any effect on hearts from aged rats (Fig. 5A and B). On the other hand, tBHQ preconditioning produced a slight decrease, although not significant, in the lipid peroxidation of adult hearts in

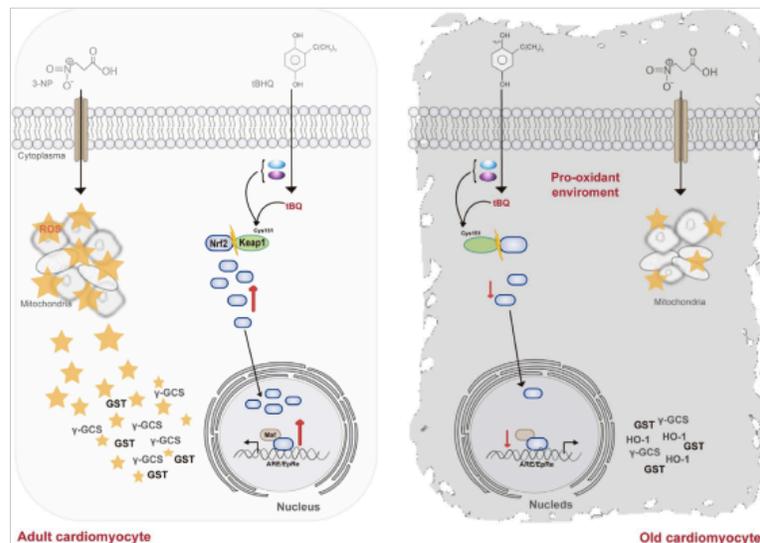
comparison with aged hearts (Fig. 5B). However, in both aged groups, tBHQ-preconditioning increased significantly protein oxidation (Fig. 5A). GSH content was lower in control aged hearts than in hearts from control adult animals (Fig. 5C,  $p < 0.05$ ); 3-NP and PreC adult groups hearts had similar GSH values than their age controls, but tBHQ-preconditioning diminished GSH content in hearts from old rats ( $p < 0.05$ ) compared to 3-NP-treatment. These results suggest that sustained oxidative stress during the aging process reaches a threshold that cannot be surpassed by 3-NP action.

### 3.5. Nrf2 nuclear translocation

To determine if the different oxidative stress response stimulated by 3-NP-treatment in hearts from adult and elderly rats was related with changes in Nrf2 regulation, we evaluate its expression and localization in nucleus and cytosol under the different treatments. Western blot analysis showed that Nrf2 levels in cardiac homogenates were similar between adult and old animals (Fig. 6A and B). Nuclear Nrf2 content significantly diminished ( $p < 0.01$ ) in the 3-NP adult group as compared with the control and tBHQ adult groups, and was recovered ( $p < 0.001$ ) in the PreC group (Fig. 6C and E). Conversely, only 3-NP augmented Nrf2 levels ( $p < 0.05$ ) in the nucleus of aged hearts (Fig. 6D and E). These results indicate that although Nrf2 expression is maintained during aging, efficient translocation depends on the stimulus. Besides, tBHQ exerts a different regulation in young and in old individuals.

### 3.6. Nrf2-ARE binding efficiency in adult and aged hearts

Nuclear extracts from adult and aged hearts were used to evaluate Nrf2 binding to ARE (antioxidant response element) under the different experimental conditions (Fig. 7A). Nrf2-ARE complex decreased in the 3-NP group ( $p < 0.05$ ) from adult hearts in comparison with the control and the tBHQ groups (Fig. 7B), but was recovered in the PreC group ( $p <$



**Fig. 8.** 3-NP exerts differential effects in cardiac tissue depending on age. 3-NP induces cellular redox imbalance due to the increase of mitochondrial ROS secondary to Complex II inhibition in heart tissue from adult animals. Conversely, the cells from old animals maintain a pro-oxidant environment, which is not modified by the neurotoxin. In adult cells, Nrf2 is activated by tBQ, the oxidized product of tBHQ which induces the dissociation of Keap1/Nrf2 complex. Subsequent translocation and nuclear activation of Nrf2, correlated with increased antioxidant enzymes such as GST and  $\gamma$ -GCS in adults; while the activation of Nrf2 is compromised in old animals. ROS, reactive oxygen species; GST, glutathione-S-transferase;  $\gamma$ -GCS, gamma glutamyl-cysteine-synthetase; HO-1, heme-oxygenase-1; tBQ, tert-butylbenzoquinone;  $O_2^-$ , superoxide anion (blue ovals);  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide (red ovals); Cys, cysteine; Maf, muscle aponeurotic fibrosarcoma; ARE/EpRE, antioxidant response element/electrophiles. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

0.01) in relation with augmented Nrf2 nuclear translocation (Fig. 6C and E) and with  $\gamma$ -glutamylcystenyl synthetase ( $\gamma$ -GCS,  $p < 0.05$ ) and glutathione S-transferase (GST,  $p < 0.001$ ) enhanced expression (Fig. 7C, D and E). Conversely, Nrf2 binding to its consensus motif decreased in hearts from all old-rats groups, being lower even than in the adult control group (Fig. 7B). Therefore, Nrf2 nuclear translocation in old rats hearts is apparently not compromised (Fig. 6D and E), but the transcription factor did not bind efficiently to its complementary sequence (Fig. 7A), precluding the up-regulation of major target antioxidant enzymes, e. g. heme-oxygenase-1 (HO-1), GST and  $\gamma$ -GCS (Fig. 7E).

#### 4. Discussion

Although HD is considered primarily a neurological disease, it has been proposed that it may be examined as a systemic disorder (Sassone et al., 2009; Van der Burg et al., 2009), because numerous peripheral organs and tissues are affected in these patients (Phan et al., 2009; Mielcarek, 2015). Even more, molecular mechanisms related to HD progression have been found not only in brain, but also in several tissues. In this respect, dilated cardiomyopathy has been observed in HD patients at both early and late stages of neuronal degeneration. Accumulation of adenine nucleotide metabolites in the serum of this patients correlated with cardiac dysfunction and impaired nucleotide metabolism in symptomatic HD mice (Toczek et al., 2016a; Toczek et al., 2016b). Other studies have associated HD pathophysiology with increased oxidative stress (Gu et al., 1996; Sapp et al., 1997; Foguem and Kamsu-Foguem, 2016). *N*-Acetyl-L-Cysteine (NAC) decreases ROS production in cells expressing polyQ and preserves their viability (Vidoni et al., 2016). Indeed, high lipid peroxidation and low GSH levels in HD patients' plasma have been reported as reliable markers of the progression of this disease (Stoy et al., 2005; Klepac et al., 2007).

Administration of the mitochondrial neurotoxin 3-NP mimics many pathological characteristics in HD. It induces caudate-putamen lesions, increases oxidative stress leading to neuronal loss and reactive gliosis in various animal models like rats (Beal et al., 1993) and primates (Brouillet et al., 1999; Lee and Chang, 2004; Browne and Beal, 2006). The use of 3-NP as a pharmacological model of HD in animals have several advantages; it reproduces the pathophysiology observed in patients (Mehan et al., 2017), it easily cross the blood-brain barrier when administered systemically (Stavrovskaya et al., 2016) and its main action has been related with mitochondrial dysfunction, in particular with complex II inhibition and ROS generation (Liot et al., 2009).

Early studies in young and adult rodents showed that acute 3-NP-treatment promoted cardiac morphological changes, characterized by sarcomere disorganization and fibrosis (Gabrielson et al., 2001), M-bands disruption (Hernández-Echeagaray et al., 2011), along with increased vasodilatation (Castillo et al., 1994) and bradycardia (Hong et al., 1990). Here, we found that 3-NP-treatment induces myofibrils disorganization only in adult hearts (Fig. 3). Interestingly, heart function was preserved in both age groups (Table 1). Discrepancies between the damage observed in the former studies and ours might be due to the higher doses of 3-NP previously used (e.g. 75–100 mg/kg). However, it is important to specify that in our model, the animals developed HD neurological characteristics related to the late stage of the disease (Silva-Palacios et al., 2017).

At the cellular level, 3-NP-treatment produced oxidative damage in adult heart (Fig. 5), confirming the concept that stresses and noxious influences exert their effects first at the molecular or biochemical level. Interestingly, such damage was only observed in adult animals but not in aged individuals (Fig. 5).

Lately hormesis has gained special attention during the aging process (Luna-López et al., 2014). Hormesis is defined as "a process in which exposure to a low dose of a chemical agent or environmental factor that is damaging at higher doses induces an adaptive beneficial effect on the cell or organism" (Calabrese and Baldwin, 2003; Rattan, 2006; Calabrese, 2008; Mattson, 2008; Hoffmann, 2009; Calabrese et al.,

2010; Holmström and Finkel, 2014). Under certain circumstances, low levels of reactive oxygen species (ROS), which are able to modify redox state, may induce an hormetic response by activating the survival and antioxidant response, that may be beneficial in the long term (Luna-López et al., 2010; Pan et al., 2011; Luna-López et al., 2014). In this sense, our results suggest that an hormetic response might have been established in aged hearts, having undergone sub-chronic oxidative stress throughout life. Sustained oxidative stress and antioxidant response might have reached a threshold that cannot be surpassed by 3-NP action (Fig. 5). In these regard, Costantini et al. (2014) have proposed that such different an unexpected responses might result from the diverse types and degrees of stress exposure, to the cellular stage at which the stressful environment was experienced, or due to the duration of stressor exposure.

3-NP administration has been associated with impaired mitochondrial function, e. g. mitochondrial membrane potential depolarization (Nasr et al., 2003), cytochrome *c* release (Antonawich et al., 2002) and ROS production (Liot et al., 2009). Besides the 3-NP specific inhibition of succinate dehydrogenase (Complex II) (Pandey et al., 2008), other mechanisms involved in 3-NP oxidative stress generation involve decreased mitochondrial Complex I (Pandey et al., 2008) and III activities (Orozco-Ibarra et al., 2016). Indeed, it has been proposed that complex II, regulates mitochondrial ROS production through a succinate-dependent interaction with complex I (Zoccarato et al., 2009, 2011). Furthermore, *in vitro* studies have shown that in the presence of 3-NP, mitochondria generate superoxide from a site located between the ubiquinol pool and 3-NP-binding site in complex I (Bacsi et al., 2006).

On the other hand, Meng et al. (2017) recently proposed a new concept called redox-stress response capacity (RRC) to describe cells ability to respond to oxidative stress; specifically to generate a dynamic response to maintain cellular redox homeostasis. Oxidative stress is considered a main feature during the natural aging process and a unifying mechanism in age-related pathologies (Silva-Palacios et al., 2016); however, some researchers have found that oxidants might have a positive effect on regulating life expectancy (Rodriguez et al., 2011) or at least, that increased ROS do not accelerates the aging process (van Remmen et al., 2003). It has also been suggested that oxidative stress effect in aging depends on specific environments or on particular stimulus (Salmon et al., 2010), and that under specific conditions the transcription of antioxidant genes is tightly regulated. Nrf2 has been recognized as the antioxidant response master transcriptional regulator and its loss or deregulation is associated with several pathologies and aging (Kumar et al., 2016). Controversial data exist on the mechanisms that lead to Nrf2 dysfunction in aged organisms, including inactivation of the factor in the cytosol, failure in its nuclear translocation or dysfunction on downstream gene expression mechanisms (Silva-Palacios et al., 2016). In this regard, a recent study reports that Nrf2 nuclear import is impaired in elderly patients (Gounder et al., 2012). Others studies have determined that nuclear Nrf2 levels in aged rats subjected to moderate exercise, reach comparable values to those observed in young mice (Done et al., 2016) and that  $\alpha$ -lipoic acid administration to old rats activates nuclear Nrf2 translocation (Suh et al., 2004). Our results add evidence to the proposal that Nrf2 activation pathway might remain intact in old animals (Fig. 7), since we did not find differences between nuclear Nrf2 levels in hearts from adult or aged rats (Fig. 6).

Thus, the hormetic response observed in the aged rats might fit into the redox-stress response capacity (RRC) concept recently described (Meng et al., 2017). Indeed, our findings highlight the priority studying Nrf2 activators as a reliable therapy to treat age-related diseases and makes mandatory to find the missing links in Nrf2 signaling and regulation during this life stage.

#### 5. Conclusion

3-NP exerts differential effects in cardiac tissue depending on age. The lack of effects observed in old animals might be related to a

previously gained hormetic response in which the threshold for oxidative damage was reached and could not be surpassed in old animals. Our data showed that the antioxidant response Nrf2 is functional in adult animals, but it is compromised in old animals (Fig. 8), possibly due to deregulation of Nrf2 signaling cascade downstream components.

## Acknowledgments

This article is part of the doctoral thesis of Alejandro Silva-Palacios in the Experimental Biology Doctoral Program, Autonomous Metropolitan University, Campus Iztapalapa. Alejandro Silva-Palacios received a scholarship from the National Council of Science and Technology (CONACyT) and this work was partially supported by Grants 177527 to CZ and FON.INST/298/2016 to MK from CONACyT, Mexico. The authors thank Dr. A. Hernández from CINVESTAV for generously donating us the actin antibody.

## References

- Abed, D.A., Goldstein, M., Albanyan, H., Jin, H., Hu, L., 2015. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm. Sin.* **36**, 285–299.
- Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., Ventura-Gallegos, J.L., Lazzarini, R., Galván-Arzate, S., González-Puertos, V.Y., Morán, J., Santamaría, A., Königsberg, M., 2014. Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP<sup>+</sup> toxicity after tBHQ pretreatment. *Neurobiol. Aging* **35**, 1901–1912.
- Antonawich, F.J., Fiore-Marasa, S.M., Parker, C.P., 2002. Modulation of apoptotic regulatory proteins and early activation of cytochrome C following systemic 3-nitropropionic acid administration. *Brain Res. Bull.* **57**, 647–649.
- Bacsi, A., Woodberry, M., Widger, W., Papaconstantinou, J., Mitra, S., Peterson, J.W., Boldogh, I., 2006. Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells. *Mitochondrion* **6**, 235–244.
- Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Miller, J.M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B.R., Hyman, B.T., 1993. Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* **13**, 4181–4192.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M.F., Hantraye, P., 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* **59**, 427–468.
- Browne, S.E., Beal, M.F., 2006. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 2061–2073.
- Buelna-Chontal, M., Guevara-Chávez, J.G., Silva-Palacios, A., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Zazueta, C., 2014. Nrf2-regulated antioxidant response is activated by thapsigargin in C in postconditioned rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* **74**, 145–156.
- Calabrese, E.J., 2008. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. *J. Ageing Res. Rev.* **7**, 8–20.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. Hormesis at the National Toxicology Program (NTP): evidence of hormetic dose responses in NTP doserange studies. *Nonlinear Biol. Toxicol. Med.* **1**, 455–467.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Mancuso, C., Lentile, R., Stella, A.M., Butterfield, D.A., 2010. Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol. Biol.* **610**, 285–308.
- Castillo, C., Valencia, I., Reyes, G., Hong, E., 1993. 3-Nitropropionic acid, obtained from *Aspergillus* species has vasodilator and hypotensive properties. *Drug Dev. Res.* **28**, 183–188.
- Castillo, C., Reyes, G., Rosas-Lezama, M.A., Valencia, I., Hong, E., 1994. Analysis of the cardiodepressor action of 3-nitropropionic acid. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **37**, 41–42.
- Cho, K.J., Kim, G.W., 2015. Differential caspase activity in the cortex and striatum with chronic infusion of 3-nitropropionic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **465**, 631–637.
- Costantini, D., Monaghan, P., Metcalfe, N.B., 2014. Prior hormetic priming is costly under environmental mismatch. *Biol. Lett.* **10**, 20131010.
- Done, A.J., Gage, M.J., Nieto, N.C., Traustadóttir, T., 2016. Exercise-induced Nrf2-signaling is impaired in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **96**, 130–138.
- Foguerm, C., Kamsu-Foguerm, B., 2016. Neurodegeneration in tauopathies and synucleinopathies. *Rev. Neurol. (Paris)* **172**, 709–714.
- Gabrielson, K.L., Hogue, B.A., Bohr, V.A., Cardouel, A.J., Nakajima, W., Kofler, J., Zweier, J.L., Rodriguez, E.R., Martin, L.J., de Souza-Pinto, N.C., Bressler, J., 2001. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces cardiac and neurotoxicity differentially in mice. *Am. J. Pathol.* **159**, 1507–1520.
- Gounder, S.S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C.J., Whitehead, K.J., Odelberg, S.J., Firpo, M.A., Paine 3rd, R., Hoidal, J.R., Abel, E.D., Rajasekaran, N.S., 2012. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One* **7**, e45697.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* **39**, 385–389.
- Hariharan, A., Shetty, S., Shirole, T., Jagtap, A.G., 2014. Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology* **45**, 139–148.
- Hernández-Echeagaray, E., González, N., Ruelas, A., Mendoza, E., Rodríguez-Martínez, E., Antuna-Bizarro, R., 2011. Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Neurol. Sci.* **32**, 241–254.
- Hernández-Reséndiz, S., Roldán, F.J., Correa, F., Martínez-Abundis, E., Osorio-Valencia, G., Ruiz-de-Jesús, O., Alexánder-Rosas, E., Viguera, R.M., Franco, M., Zazueta, C., 2013. Postconditioning protects against reperfusion injury in hypertensive dilated cardiomyopathy by activating MEK/ERK1/2 signaling. *J. Card. Fail.* **19**, 135–146.
- Hernández-Reséndiz, S., Palma-Flores, C., De Los Santos, S., Román-Anguiano, N.G., Flores, M., de la Peña, A., Flores, P.L., Fernández-G, J.M., Coral-Vázquez, R.M., Zazueta, C., 2015. Reduction of no-reflow and reperfusion injury with the synthetic 17 $\beta$ -aminosteroid compound Prolame is associated with PI3K/Akt/eNOS signaling cascade. *Basic Res. Cardiol.* **110**, 1–12.
- Hoffmann, G.R., 2009. A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response* **7**, 1–51.
- Holmström, K.M., Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 411–421.
- Hong, E., Castillo, C., Rivero, I., Somanathan, R., 1990. Vasodilator and antihypertensive actions of 3-nitropropionic acid. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **33**, 209–211.
- Kiriazis, H., Jennings, N.L., Davern, P., Lambert, G., Su, Y., Pang, T., Du, X., La Greca, L., Head, G.A., Hannan, A.J., Du, X.J., 2012. Neurocardiac dysregulation and neurogenic arrhythmias in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Physiol.* **590**, 5845–5860.
- Klepac, N., Relja, M., Klepac, R., Hecimovic, S., Babic, T., Trkulja, V., 2007. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects: a cross-sectional study. *J. Neurosci.* **27**, 1676–1683.
- Kumar, R.R., Narasimhan, M., Shanmugam, G., Hong, J., Devarajan, A., Palaniappan, S., Zhang, J., Halade, G.V., Darley-Usmar, V.M., Hoidal, J.R., Rajasekaran, N.S., 2016. Abrogation of Nrf2 impairs antioxidant signaling and promotes atrial hypertrophy in response to high-intensity exercise stress. *J. Transl. Med.* **14**, 86.
- Lanska, D.J., Lavine, L., Lanska, M.J., Schoenberg, B.S., 1998. Huntington's disease mortality in the United States. *Neurology* **38**, 769–772.
- Lee, W.T., Chang, C., 2004. Magnetic resonance imaging and spectroscopy in assessing 3-nitropropionic acid-induced brain lesions: an animal model of Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **72**, 87–110.
- Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., Bossy-Wetzel, E., 2009. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* **16**, 899–909.
- Lopez, P.S., Castillo, C.H., Pastelin, G.H., Hernández, M.R., Suárez, M.J., Sánchez, M.L., Escalante, B.A., 1998. Characterization of 3-nitropropionic acid-induced bradycardia in isolated atria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148**, 1–6.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Lu, M.C., Ji, J.A., Jiang, Z.Y., You, Q.D., 2016. The Keap1-Nrf2-ARE pathways as a potential preventive and therapeutic target: an update. *Med. Res. Rev.* **36**, 924–963.
- Luna-López, A., Triana-Martínez, F., López-Diazguerrero, N.E., Ventura-Gallegos, J.L., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Damián-Matsumura, P., Zentella, A., Gómez-Quiroz, L.E., Königsberg, M., 2010. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1192–1204.
- Luna-López, A., González-Puertos, V.Y., López-Diazguerrero, N.E., Königsberg, M., 2014. New considerations on hormetic response against oxidative stress. *J. Cell Commun. Signal.* **8**, 323–331.
- Mattson, M.P., 2008. Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways. *Hum. Exp. Toxicol.* **27**, 155–162.
- Mehar, S., Parveen, S., Kaur, G., Kukkar, U., Dudi, R., Rajput, M., Kalra, S., 2017. Targeting phytochemical driver in AC/cAMP/PKA/CREB activation: the next frontier for alleviating Huntington's type neurodegenerative disorders in 3-NP animal model: a complete review. *EC Neurol.* **6** (3), 77–131.
- Meng, J., Lv, Z., Qiao, X., Li, X., Li, Y., Zhang, Y., Chen, C., 2017. The decay of redox-stress response capacity is a substantive characteristic of aging: revising the redox theory of aging. *Redox Biol.* **11**, 365–374.
- Menze, E.T., Esmat, A., Tadros, M.G., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, A.B., 2016. Genistein improves sensorimotor gating: mechanisms related to its neuroprotective effects on the striatum. *Neuropharmacology* **105**, 35–46.
- Mielcarek, M., 2015. Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis.* **3**, e1058464.
- Mielcarek, M., Inuabasi, L., Bondulich, M.K., Muller, T., Osborne, G.F., Franklin, S.A., Smith, D.L., Neueder, A., Rosinski, J., Rattray, I., Protti, A., Bates, G.P., 2014a. Dysfunction of the CNS-heart axis in mouse models of Huntington's disease. *PLoS Genet.* **10**, e1004550.
- Mielcarek, M., Bondulich, M.K., Inuabasi, L., Franklin, S.A., Muller, T., Bates, G.P., 2014b. The Huntington's disease-related cardiomyopathy prevents a hypertrophic response in the R6/2 mouse model. *PLoS One* **9**, e108961.
- Mihm, M.J., Amann, D.M., Schanbacher, B.L., Altschuld, R.A., Bauer, J.A., Hoyt, K.R., 2007. Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **25**, 297–308.
- Miller, C.J., Gounder, S.S., Kannan, S., Goutam, K., Muthusamy, V.R., Firpo, M.A., Symons, J.D., Paine III, R., Hoidal, J.R., Rajasekaran, N.S., 2012. Disruption of Nrf2-ARE signaling impairs antioxidant mechanisms and promotes cell degradation pathways in aged skeletal muscle. *Biochim Biophys. Acta* **1822**, 1038–1050.
- Mirandola, S.R., Melo, D.R., Saito, A., Castilho, R.F., 2010. 3-Nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J. Neurosci. Res.* **88**, 630–639.
- Nasr, P., Gursahani, H.I., Pang, Z., Bondada, V., Lee, J., Hadley, R.W., Geddes, J.W., 2003. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca<sup>2+</sup>, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem. Int.* **43**, 89–99.

- Orozco-Ibarra, M., García-Morales, J., Calvo-Silva, F.J., Fernández-Valverde, F., Serrano-García, N., 2016. Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr. Neurosci.* 28, 1–11.
- Pan, Y., Schroeder, E.A., Ocampo, A., Barrientos, A., Shadel, G.S., 2011. Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptative mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab.* 13, 668–678.
- Pandey, M., Varghese, M., Sindhu, K.M., Sreetama, S., Navneet, A.K., Mohanakumar, K.P., Usha, R., 2008. Mitochondrial NAD<sup>+</sup>-linked state 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 104, 420–434.
- Penning, T.M., 2017. Aldo-keto reductase regulation by the Nrf2 system: implications for stress response, chemotherapy drug resistance, and carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 162–176.
- Persky, A.M., Green, P.S., Stuble, L., Howell, C.O., Zaulyanov, L., Brazeau, G.A., Simpkins, J.W., 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 59–66.
- Phan, J., Hickey, M.A., Zhang, P., Chesselet, M.F., Reue, K., 2009. Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1006–1016.
- Rattan, S.I., 2006. Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress. *Dose-Response* 3, 533–546.
- Rodriguez, K.A., Wywiał, E., Perez, V.I., Lambert, A.J., Edrey, Y.H., Lewis, K.N., Lindsey, M.L., Brand, M.D., Buffenstein, R., 2011. Walking the oxidative stress tightrope: a perspective from the naked mole-rat, the longest-living rodent. *Curr. Pharm. Des.* 17, 2290–2307.
- Safdar, A., deBeer, J., Tarnopolsky, M.A., 2010. Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1487–1493.
- Salmon, A.B., Richardson, A., Pérez, V.I., 2010. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic. Biol. Med.* 48, 642–655.
- Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P.G., Young, A.B., Penney, J., Vonsattel, J.P., Aronin, N., DiFiglia, M., 1997. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann. Neurol.* 42, 604–612.
- Sassone, J., Colciago, C., Cislighi, G., Silani, V., Ciammola, A., 2009. Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues. *Exp. Neurol.* 219, 385–397.
- Silva-Palacios, A., Königsberg, M., Zazueta, C., 2016. Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: a potential target to prevent cardiovascular diseases? *Ageing Res. Rev.* 6, 81–95.
- Silva-Palacios, A., Colín-González, A.L., López-Cervantes, S.P., Zazueta, C., Luna-López, A., Santamaría, A., Königsberg, M., 2017. Tert-butylhydroquinone pre-conditioning exerts dual effects in old female rats exposed to 3-nitropropionic acid. *Redox Biol.* 12, 610–624.
- Sorensen, S.A., Fenger, K., 1992. Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. *J. Med. Genet.* 29, 911–914.
- Stavrovskaya, A.V., Voronkov, D.N., Yamshchikova, N.G., Ol'shanskiy, A.S., Khudovkov, R.M., Illarionov, S.N., 2016. Experience of experimental modelling of Huntington's disease. *Hum. Physiol.* 42, 898–904.
- Stein, A.B., Tiwari, S., Thomas, P., Hunt, G., Levent, C., Stoddard, M.F., Tang, X.L., Bolk, R., Dawn, B., 2007. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. *Basic Res. Cardiol.* 102, 28–41.
- Stoy, N., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T.W., Darlington, L.G., 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J. Neurochem.* 93, 611–623.
- Suh, J.H., Shen, S.V., Dixon, B.M., Liu, H., Jaiswal, A.K., Liu, R.M., Hagen, T.M., 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3381–3386.
- Tozcek, M., Kutryb-Zajac, B., Zukowska, P., Slominska, E.M., Isalan, M., Mielcarek, M., Smolenski, R.T., 2016a. Changes in cardiac nucleotide metabolism in Huntington's disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 35, 707–712.
- Tozcek, M., Zielonka, D., Zukowska, P., Marcinkowski, J.T., Slominska, E., Isalan, M., Smolenski, R.T., Mielcarek, M., 2016b. An impaired metabolism of nucleotides underpins a novel mechanism of cardiac remodeling leading to Huntington's disease related cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 2147–2157.
- Van der Burg, J.M., Björkqvist, M., Brundin, P., 2009. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 8, 765–774.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R., Richardson, A., 2003. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics* 16, 29–37.
- Vidoni, C., Castiglioni, A., Seca, C., Secomandi, E., Melone, M.A., Isidoro, C., 2016. Dopamine exacerbates mutant Huntingtin toxicity via oxidative-mediated inhibition of autophagy in SH-SY5Y neuroblastoma cells: beneficial effects of anti-oxidant therapeutics. *Neurochem. Int.* 101, 132–143.
- Wood, N.J., Sawiak, S.J., Buonincontri, G., Niu, Y., Kane, A.D., Carpenter, T.A., Giussani, D.A., Morton, A.J., 2012. Direct evidence of progressive cardiac dysfunction in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Huntingtons Dis.* 1, 57–64.
- Wu, B.T., Chiang, M.C., Tasi, C.Y., Kuo, C.H., Shyu, W.C., Kao, C.L., Huang, C.Y., Lee, S.D., 2016. Cardiac Fas-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathways in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Cardiovasc. Toxicol.* 16, 111–121.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Mielcarek, M., 2014. Cardiac dysfunction in Huntington's disease. *Exp. Clin. Cardiol.* 20, 2547–2554.
- Zoccarato, F., Cavallini, L., Alexandre, A., 2009. Succinate is the controller of O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release at mitochondrial complex I: negative modulation by malate, positive by cyanide. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 387–393.
- Zoccarato, F., Miotto, C., Cavallini, L., Alexandre, A., 2011. The control of mitochondrial succinate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 359–366.



## Review

## Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases?

Alejandro Silva-Palacios<sup>a,b</sup>, Mina Königsberg<sup>b</sup>, Cecilia Zazueta<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Cardiovascular Biomedicine, National Institute of Cardiology "Ignacio Chavez", Juan Badiano No. 1, Section XVI, 14080 D.F. Mexico, Mexico<sup>b</sup> Department of Health Sciences, Autonomous Metropolitan University–Iztapalapa, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 August 2015

Received in revised form 9 December 2015

Accepted 21 December 2015

Available online 28 December 2015

## Keywords:

Aging

Cardiovascular system

Oxidative stress

Nrf2

## ABSTRACT

Aging process is often accompanied with a high incidence of cardiovascular diseases (CVD) due to the synergistic effects of age-related changes in heart morphology/function and prolonged exposure to injurious effects of CVD risk factors. Oxidative stress, considered a hallmark of aging, is also an important feature in pathologies that predispose to CVD development, like hypertension, diabetes and obesity. Approaches directed to prevent the occurrence of CVD during aging have been explored both in experimental models and in controlled clinical trials, in order to improve health span, reduce hospitalizations and increase life quality during elderly. In this review we discuss oxidative stress role as a main risk factor that relates CVD with aging. As well as interventions that aim to reduce oxidative stress by supplementing with exogenous antioxidants. In particular, strategies of improving the endogenous antioxidant defenses through activating the nuclear factor related-2 factor (Nrf2) pathway; one of the best studied molecules in cellular redox homeostasis and a master regulator of the antioxidant and phase II detoxification response.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	82
2. Cardiovascular changes during aging .....	82
2.1. Structural and functional changes .....	82
3. Etiology of CVD during aging .....	82
3.1. Cardiac hypertrophy .....	82
3.2. Heart failure .....	84
3.3. Ischemic heart disease .....	84
4. Oxidative stress a main contributor to risk factors for CVD development during aging .....	85
4.1. Hypertension .....	85
4.2. Obesity .....	86
4.3. Diabetes .....	87
5. Nrf2 and age-related cardiovascular diseases .....	87
6. Cardioprotection strategies based on enhanced antioxidant response in elderly .....	87
6.1. Sulforaphane .....	89
6.2. Curcumin .....	89
6.3. Resveratrol .....	89
6.4. <i>Tert</i> -butylhydroquinone .....	90
7. Conclusion .....	90
Acknowledgments .....	90
References .....	90

\* Corresponding author. Fax: +52 55 5573 0926.

E-mail address: [azazueta@yahoo.com](mailto:azazueta@yahoo.com) (C. Zazueta).<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.12.005>

1568-1637/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

## Ageing Research Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/arr](http://www.elsevier.com/locate/arr)

## Review

## Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging

Silva-Palacios A.<sup>a,b,c</sup>, Ostolga-Chavarría M.<sup>b</sup>, Zazueta C.<sup>b</sup>, Königsberg M.<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, 09340, México<sup>b</sup> Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez, Ciudad de México, México<sup>c</sup> Posgrado en Biología Experimental, UAM-I, México

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Aging  
Negative regulation  
Nrf2  
Epigenetic modifications

## ABSTRACT

Increase in life-span is commonly related with age-related diseases and with gradual loss of genomic, proteomic and metabolic integrity. Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-p45 derived factor 2) controls the expression of genes whose products include antioxidant proteins, detoxifying enzymes, drug transporters and numerous cytoprotective proteins. Several experimental approaches have evaluated the potential regulation of the transcription factor Nrf2 to enhance the expression of genes that contend against accumulative oxidative stress and promote healthy aging. Negative regulators of Nrf2 that act preventing its binding to DNA-responsive elements, have been identified in young and adult animal models. However, it is not clearly established if Nrf2 decreased activity in several models of aging results from disruption of that regulation. In this review, we present a compilation of evidences showing that changes in the levels or activity of Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1), GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3), Bach1, p53, Hrd1 (E3 ubiquitin ligase) and miRNAs might impact on Nrf2 activity during elderly. We conclude that understanding Nrf2 regulatory mechanisms is essential to develop a rational strategy to prevent the loss of cellular protection response during aging.

## 1. Introduction

The need to understand why we become old and the desire to prevent it, have accompanied humanity since ancient times. This question has taken relevance in the last decades because the elderly population has dramatically augmented on a global scale (Horn, 2015). A special case of successful aging in humans are the centenarians who, by definition, are extremely old people that show all the signs and characteristics of a prolonged aging process, while avoiding or postponing the beginning of the decline related to age (Franceschi and Bonafè, 2003; Ismail et al., 2016; Kheirbek et al., 2017). Therefore, the study of centenarians has shed light on some basic mechanisms of aging and longevity in humans, allowing us to consider other variables-difficult to study in animal models-such as demography, population genetics and variables related to cultural habits, such as lifestyle and personality, typical of humans and that undoubtedly play an important role in aging and longevity (Franceschi and Garagnani, 2016; Franceschi et al., 2017a). Molecular studies focused on elucidating the mechanisms that safeguard aging in humans have been addressed. For example, Lattanzi et al. (2014) showed that rapamycin affects pre-lamin A levels and favors the recruitment of nuclear protein 53BP1, thus mimicking the nuclear environment observed in cells of centenarian individuals

(95–105 years). Still, more experiments must be done in order to understand their successful aging.

Although medical research and basic science have managed to expand longevity, both in laboratory models and in humans, lifespan increase does not always go hand in hand with health span. This is clearly seen in a large part of the human population, where there is an important period of frailty during the last years of life (Herndon et al., 2002). Older adults have a greater susceptibility to develop pathological conditions, which augment the number of hospitalizations, generating a financial deficit in public health systems. Decreased health and fitness, together with greater difficulty to overcome illnesses or physical stress, lead to permanent loss of functions and increased mortality in the elderly (Lewis et al., 2010; Camici et al., 2015). Although it is believed that these traits in old age are due to a gradual loss of genomic, proteomic and metabolic integrity (Lewis et al., 2010), the accurate mechanisms that induce this deterioration remain unknown. The identification of those pathways would undoubtedly bring opportunities to improve quality of life during aging.

In aging models such as yeast, worms, and flies, lifespan has increased from 40 to more than 200% by mutating genes such as *age-1*/*PI3-K* (phosphoinositide 3-kinase) (Friedman and Johnson, 1988) or *daf-2*/*IGF-1* (insulin like growth factor-1) (Kenyon et al., 1993).

\* Corresponding authorat: Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-525, C.P. 09340, Ciudad de México, México.

E-mail addresses: [mkf@xanum.uam.mx](mailto:mkf@xanum.uam.mx), [mina.konigsberg@fulbrighmail.org](mailto:mina.konigsberg@fulbrighmail.org) (M. Königsberg).

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.06.003>

Received 1 March 2018; Received in revised form 11 June 2018; Accepted 12 June 2018  
1568-1637/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00109

Matrícula: 2151802749

INDUCCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 EN DOS CONTEXTOS PATOLÓGICOS: ENFERMEDAD DE HUNTINGTON ASOCIADA A LA EDAD E ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CARDIACA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO  
DRA. MABEL BUELNA CHONTAL  
DR. ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL  
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ



ALEJANDRO SILVA PALACIOS  
ALUMNO

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

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ALEJANDRO SILVA PALACIOS

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

Aprobar

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

VOCAL

DRA. MABEL BUELNA CHONTAL

VOCAL

DR. ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

SECRETARIO

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ