



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

El papel del sistema antioxidante glutatión sobre la producción de ácido kinurénico (KYNA) en el Sistema Nervioso Central

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

PRESENTA

M. en C. TONALI BLANCO AYALA

Comité tutorial:

Codirectora Interna

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Depto. de Biología de la Reproducción, DCBS, UAM-I

Codirectora Externa

Dra. Verónica Pérez De la Cruz

Lab. de Neurobioquímica y Conducta, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Asesor

Dr. Benjamín Pineda Olvera

Depto. de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Matrícula: 2173801611
tonaliblaya@gmail.com

Declaración de originalidad

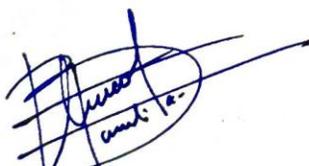
El (La) que suscribe **Tonali Blanco Ayala**, alumno (a) del posgrado en **Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "**El papel del sistema antioxidante glutatión sobre la producción de ácido kinurénico (KYNA) en el Sistema Nervioso Central**",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el jurado evaluador asignado por la Comisión Académica de Posgrado en Biología Experimental por para lo obtención del grado de **Doctorado** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 14 de Febrero del 2022.

Atentamente



Tonali Blanco Ayala

Nombre y firma del alumno

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTA

Dra. Roxana Uri Miranda Labra.

Depto. Ciencias de la Salud. DCBS, UAM-I.roxml@xanum.uam.mx

SECRETARIA

Dra. Dinora González Esquivel

Lab. de Neuroquímica y Conducta, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
dinora.gonzalez@inn.edu.mx

VOCAL

Dr. Benjamín Pineda Olvera

Depto. de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
benpio76@hotmail.com

VOCAL

Dr. Paul Carrillo Mora

División de Investigación en Neurociencias, Instituto Nacional de Rehabilitación
.neuropcm@gmail.com

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Codirectora Interna

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Depto. de Biología de la Reproducción, DCBS, UAM-Iaja@xanum.uam.mx

Codirectora Externa

Dra. Verónica Pérez De la Cruz

Lab. de Neuroquímica y Conducta, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
veped@yahoo.com.mx

Asesor

Dr. Benjamín Pineda Olvera

Depto. de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
benpio76@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

Al 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.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios de posgrado:
No. de becario CONACyT: 299256 No. de Proyecto CONACyT: 286885

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Depto. de Biología de la Reproducción y al Laboratorio de Neuroquímica y Conducta, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", por permitirme desarrollar los experimentos necesarios para obtener el grado de Doctorado en Biología Experimental.

A la Dra. Anabel Jiménez Anguiano y la Dra. Verónica Pérez De la Cruz por haber dirigido el desarrollo de este proyecto de doctorado hasta su culminación.

Al Dr. Benjamín Pineda Olvera por el asesoramiento para el buen desarrollo y culminación de este proyecto.

RESUMEN

El ácido kinurénico (KYNA), un metabolito derivado del catabolismo del triptófano (Trp), tiene un rol importante en procesos cognitivos normales y patológicos, a través de su antagonismo sobre los receptores α -7-nicotínicos y NMDA. KYNA es producido a partir de kinurenina por vía no enzimática mediante su oxidación, o bien, a través de una transaminación irreversible catalizada por las kinureninas aminotransferasas. En el cerebro de mamíferos, la enzima kinurenina aminotransferasa II (KATII), es la principal enzima responsable de la producción de KYNA, constituyendo un blanco de interés farmacológico para intervenciones pro-cognitivas. La N-acetilcisteína (NAC), un fármaco permeable a la barrera hematoencefálica, posee efectos pro-cognitivos atribuidos principalmente al incremento de los niveles endógenos de glutatión (GSH) en cerebro. El objetivo del presente estudio se centró en determinar el efecto del antioxidante y precursor de glutatión N-acetilcisteína sobre los niveles cerebrales de KYNA como posible mecanismo neuromodulador de los efectos pro-cognitivos atribuidos a este fármaco. Nuestros resultados arrojan que NAC, y no GSH, inhibe la actividad de KATII en homogenados de cerebro de rata con una CI_{50} de ~ 2 mM. NAC también interfirió con la formación *de novo* de KYNA en rebanadas corticales de cerebro de rata y es un inhibidor competitivo para la enzima recombinante humana KATII (K_i : 450 μ M). Adicionalmente, mediante microdiálisis en la corteza media prefrontal (mPFC) se demostró que la administración de NAC (500 mg/kg, i.p., 120 y 60 min antes de la administración de kinurenina (50 mg/kg; i.p.) reduce la síntesis de KYNA en $\sim 50\%$. Además mediante una administración subcrónica de NAC (100 mg/kg, i.p./día por 7 días) examinamos si modificaba los niveles de KYNA cerebral y el rendimiento cognitivo en ratones FVB. Se determinaron marcadores redox, niveles de KYNA, y la actividad de KATII cerebrales. También se determinó el efecto *ex vivo* de NAC en el catabolismo del Trp en rebanadas corticales. Finalmente, se evaluó la memoria y el aprendizaje con y sin un reto agudo con L-kinurenina (Kyn; 100 mg/kg). En el tejido cerebral, la administración subcrónica de NAC protegió del daño ante un desafío pro-oxidante agudo, redujo los niveles y la síntesis de KYNA y la actividad de KATII y mejoró la memoria en condiciones basales y después del tratamiento con Kyn. En conjunto, estos resultados sugieren que NAC ejerce sus efectos neurobiológicos en parte reduciendo la síntesis de KYNA al inhibir a la KATII y también indican que el tratamiento subcrónico de NAC mejora la memoria a través de la reducción de los niveles cerebrales de KYNA, lo que sugiere que los efectos de NAC en la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica es a través de la modulación de este metabolito.

ABSTRACT

The tryptophan metabolite kynurenic acid (KYNA) may play an important role in normal and abnormal cognitive processes, most likely by interfering with α -7 nicotinic and NMDA receptor function. KYNA is formed from its immediate precursor kynurenine either by non-enzymatic oxidation or through irreversible transamination by kynurenine aminotransferases. In the mammalian brain, kynurenine aminotransferase II (KAT II) is the principal enzyme responsible for the synthesis of rapidly mobilizable KYNA, and therefore constitutes an attractive target for pro-cognitive interventions. N-acetylcysteine (NAC), a brain-penetrant drug with pro-cognitive efficacy in humans, has been proposed to exert its actions by increasing the levels of the antioxidant glutathione (GSH) in the brain. The aim of the present study was to determine the effect of the antioxidant and glutathione precursor N-acetylcysteine on brain levels of KYNA as a possible neuromodulatory mechanism mediating the pro-cognitive effects attributed to this drug. We report here that NAC, but not GSH, inhibits KAT II activity in brain tissue homogenates from rats with IC_{50} values in the high micromolar to low millimolar range. With similar potency, the drug interfered with the *de novo* formation of KYNA in rat brain slices, and NAC was a competitive inhibitor of recombinant human KAT II (K_i : 450 μ M). Shown by microdialysis in the prefrontal cortex of rats treated with kynurenine (50 mg/kg, i.p.), peripheral administration of NAC (500 mg/kg, i.p., 120 and 60 min before the application of kynurenine) reduced KYNA synthesis by ~50%. Then, we examined if repeated systemic administration of NAC influences brain KYNA and cognitive performance in mice. Animals received NAC (100 mg/kg, i.p.) daily for 7 days. Redox markers, KYNA levels, and KAT II activity were determined in the brain. We also assessed the effect of repeated NAC treatment on Trp catabolism using brain tissue slices *ex vivo*. Finally, learning and memory was evaluated with and without an acute challenge with KYNA's bioprecursor L-kynurenine (Kyn; 100 mg/kg). Subchronic NAC administration protected against an acute pro-oxidant challenge, decreased KYNA levels, and lowered KAT II activity and improved memory both under basal conditions and after acute Kyn treatment. In tissue slices from these mice, KYNA synthesis from Trp or Kyn was reduced. Together, these results suggest that NAC exerts its neurobiological effects at least in part by reducing cerebral KYNA formation via KAT II inhibition and indicate that prolonged treatment with NAC may enhance memory at least in part by reducing brain KYNA levels thus modulating the glutamatergic and cholinergic neurotransmission.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
1.1 VÍA DE LAS KINURENINAS	3
1.1.2 Regulación de la VK.....	4
1.2 ÁCIDO KINURÉNICO	8
1.2.1 VÍAS DE SÍNTESIS DE KYNA	8
1.3 PROPIEDADES DE KYNA	12
1.3.1 PROPIEDADES NEUROMODULADORAS	12
1.3.2 PROPIEDADES REDOX	14
1.4 KYNA EN COGNICIÓN.....	16
1.5 IMPORTANCIA DE KYNA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y DESÓRDENES PSIQUIÁTRICOS	21
1.6 SISTEMAS ANTIOXIDANTES: POTENCIALES REGULADORES DE LA VÍA ALTERNATIVA DE FORMACIÓN DE KYNA POR INTERACCIÓN DIRECTA CON ERO/ ERN	23
1.6.1 SISTEMA ANTIOXIDANTE GLUTATIÓN	24
1.6.2 GSH EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	25
1.7 N-ACETILCISTEÍNA Y LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	26
1.7.1 NAC EN DESÓRDENES NEUROLÓGICOS: MECANISMOS DE ACCIÓN Y OPORTUNIDADES TERAPEÚTICAS.....	29
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVO GENERAL	35
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	35
5. MÉTODOS.....	36
5.1 Estandarización de cultivos primarios de astrocitos	36
5.2 Preparación de homogenados de cerebro	36
5.3 Rebanadas corticales de cerebro	36
5.3.1 Incubación de rebanadas corticales	37
5.4 Implantación de cánulas	38
5.5 Microdiálisis.....	38
5.6 Determinación de niveles de KYNA por HPLC	39
5.7 Actividad enzimática de KATII	40
5.8 Determinación de la actividad de KMO y 3HK	41
5.9 Determinación de proteínas	42

5.10 Cuantificación de GSH/ GSSG.....	42
5.11 Tratamiento Subcrónico con NAC.....	43
5.12 Disección y recolección de tejido cerebral.....	44
5.13 Evaluación de la memoria y aprendizaje por el paradigma de la ubicación del alimento enterrado	45
5.14 Actividad locomotora.....	46
5.15 Determinación de Peroxidación de Lípidos (PL) y ERO.....	46
6. RESULTADOS	47
6.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE GSH Y NAC SOBRE LA PRODUCCIÓN DE KYNA EN ASTROCITOS PRIMARIOS.....	47
6.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE GSH Y NAC EN LA PRODUCCIÓN DE NOVO DE KYNA EN HOMOGENADOS DE CEREBRO E HÍGADO DE RATA	49
6.3 EFECTO DE NAC EN LA PRODUCCIÓN <i>DE NOVO</i> DE KYNA EN REBANADAS CORTICALES DE CEREBRO DE RATA.....	53
6.3.1 NAC INDUCE LA SÍNTESIS DE GSH EN REBANADAS CORTICALES SÓLO A	56
ALTAS CONCENTRACIONES.....	56
6.3 NAC INHIBE LA ACTIVIDAD DE KATII IN VITRO EN HOMOGENADOS DE CEREBRO E HÍGADO DE RATA	57
6.4 NAC, PERO NO GSH, INHIBE A LA KATII HUMANA (hKATII) DE	59
MANERA CONCENTRACIÓN-DEPENDIENTE	59
6.4.1 EFECTO DE NAC SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA hKATII RECOMBINANTE.....	60
CON CONCENTRACIONES VARIABLES DEL SUSTRATO KINURENINA	60
6.5 EFECTO IN VIVO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBRAL DE NAC EN LA PRODUCCIÓN DE NOVO DE KYNA EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATA	61
6.6 LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE NAC ATENÚA LA SÍNTESIS DE.....	63
KYNA EN LA mPFC DE RATA IN VIVO	63
6.6.1 LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE BSO NO PREVIENE EL EFECTO DE NAC EN	66
LOS NIVELES DE KYNA EN LA mPFC DE RATA IN VIVO	66
6.7 NAC ATENÚA LA SÍNTESIS DE KYNA EN LA mPFC DE RATA IN VIVO A.....	67
PARTIR DEL TRIPTÓFANO	67
6.8 LOS NIVELES DE GSH TOTAL, GSH Y GSSG CUANTIFICADOS EN.....	69
HÍGADO, CEREBRO, CEREBELO Y PLASMA NO INCREMENTAN TRAS LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE NAC	69
6.9 LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE NAC EN RATONES DISMINUYE	73
LOS NIVELES DE KYNA, REDUCE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE KATII E INCREMENTA LOS NIVELES DE 3-HK EN CEREBRO.....	73
6.9.1 EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO DE NAC REDUCE LA SÍNTESIS DE KYNA	75
EX VIVO EN REBANADAS DE TEJIDO CEREBRAL	75
6.9.2 EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO DE NAC MEJORA EL RENDIMIENTO	76

COGNITIVO EN LA PRUEBA DE MEMORIA DE ALIMENTO ENTERRADO (BFT)	76
6.9.3 LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE NAC REDUCE LAS ERO Y LA PL ESTIMULADA POR EL PRO- OXIDANTE FeSO ₄ SIN INCREMENTAR LOS NIVELES DE GSH EN EL CEREBRO.....	81
7. DISCUSIÓN.....	84
9. REFERENCIAS.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

α7nACh	α -7-nicotínico
AA	ácido antranílico
Ach	acetilcolina
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro
BHE	barrera hematoencefálica
CCCP	carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona
CO₂	dióxido de carbono
Cys	cisteína
DA	dopamina
EH	enfermedad de Huntington
ERN	especies reactivas de nitrógeno
ERO	las especies reactivas de oxígeno/
FVB	Ratón Friend leucemia virus B
GABA	ácido γ -aminobutírico
GCL	γ -glutamil-cisteína ligasa
Glu	glutamato
Gly	glicina
GSH	glutación
GST	glutación-S-transferasa
3-HA	3-hidroxiantranílico
3-HAO	3-hidroxiantranilato dioxigenasa
3-HK	3-hidroxikunurenina
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
IDO	indolamina 2,3-dioxigenasa
KAT	kinurenina aminotransferasa
KMO	kinurenina monooxigenasa
KYN	kinurenina
KYNA	ácido kinurénico
L-KYN	L-kinurenia
LPS	lipopolisacárido bacteriano
NAC	N-acetilcisteína

NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido
O₂⁻	anión superóxido
OH•	radicales hidroxilo y
ON	óxido nítrico
ON•	óxido nítrico
ONOO⁻	y peroxinitrito
•OOH	radical hidroperoxilo
PIC	ácido picolínico
QPRT	quinolinato fosforibosil transferasa
QUIN	ácido quinolínico
RL	radicales libres
rNMDA	receptores N-metil-D-aspartato
ROO•	radicales peroxilo
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	superóxido dismutasa
TDO	la triptófano dioxigenasa
Trp	triptófano
VK	vía de las kinurenina

1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 VÍA DE LAS KINURENINAS

El metabolismo del aminoácido esencial triptófano da lugar a una gran diversidad de moléculas bioactivas entre las cuales el neurotransmisor serotonina es la más reconocida. Sin embargo, en el Sistema Nervioso Central (SNC) menos del 1% del catabolismo del triptófano (Trp) es utilizado para la producción de serotonina o bien, para la síntesis de proteínas; el resto, que representa alrededor del 95% es degradado principalmente mediante la vía de las kinureninas (VK) (Schwarcz *et al.*, 2012). La VK se encuentra presente en humanos, roedores, así como en otros mamíferos. Los metabolitos derivados de esta vía, las kinureninas, se generan gracias a la acción de distintas enzimas que se localizan principalmente en cerebro e hígado, sin embargo, también se encuentran presentes en células del sistema inmune, intestino y músculo (Savitz, 2020).

La VK es particularmente relevante para la generación de energía celular ya que mediante esta vía se lleva a cabo la biosíntesis del cofactor enzimático nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). Este cofactor participa en reacciones de óxido-reducción al interior celular permitiendo el intercambio y transferencia de electrones para la generación de energía por fosforilación oxidativa. Sin embargo, antes de generar este producto final, la VK produce una serie de metabolitos neuroactivos intermediarios denominados kinureninas: kinurenina (KYN), ácido kinurénico (KYNA), 3-hidroxikinurenina (3-HK), ácido picolínico (PIC) y ácido quinolínico (QUIN) (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2007; Schwarcz *et al.*, 2012; Vécsei

et al., 2013). La evidencia con la que se cuenta hasta el momento indica que en el cerebro, la VK está compartimentalizada en células de la microglía y astrocitos (Schwarcz *et al.*, 2012).

1.1.2 Regulación de la VK

La regulación de esta vía comprende la acción específica de distintas enzimas. Existen dos enzimas distintas capaces de iniciar el catabolismo del Trpa través de la VK: la triptófano dioxigenasa (TDO) localizada en hígado y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) localizada principalmente en cerebro, ambas catalizan la apertura oxidativa del anillo indólico del L-triptófano produciendo N-formil kinurenina (figura 1). Posteriormente, la N-formil kinurenina es transformada a L-kinurenina (L-KYN) mediante hidrólisis catalizada por la enzima L-KYN formamidasa; siendo L-KYN el precursor inmediato de tres enzimas distintas: kinureninasa (formando ácido antranílico (AA), $K_m = 1000 \mu\text{M}$), kinurenina monooxigenasa (KMO; formando 3-HK, $K_m = 14-25 \mu\text{M}$) y kinurenina aminotransferasa (KAT; formando KYNA, por transaminación irreversible, $K_m = 960-4700 \mu\text{M}$). Descendiendo en la vía hacia la formación de NAD^+ , 3HK sufre una reacción de hidrólisis mediada por la kinureninasa ($K_m = 77 \mu\text{M}$) para formar el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA) (Fujigaki *et al.*, 2017; Guidetti *et al.*, 1997; Thomas & Stocker, 1999). Posteriormente, la enzima 3-hidroxiantranilato dioxigenasa (3-HAO, $K_m = 2-3.6 \mu\text{M}$) abre el anillo de 3-HA para producir un intermediario inestable (2-amino-3-carboximuconato semialdehído) que es transformado inmediatamente a QUIN. Finalmente, el QUIN es transformado a NAD^+ mediante la acción de la enzima quinolinato fosforibosil transferasa (QPRT, $K_m = 21.6 \mu\text{M}$)

localizada en astrocitos (Schwarcz *et al.*, 2012).

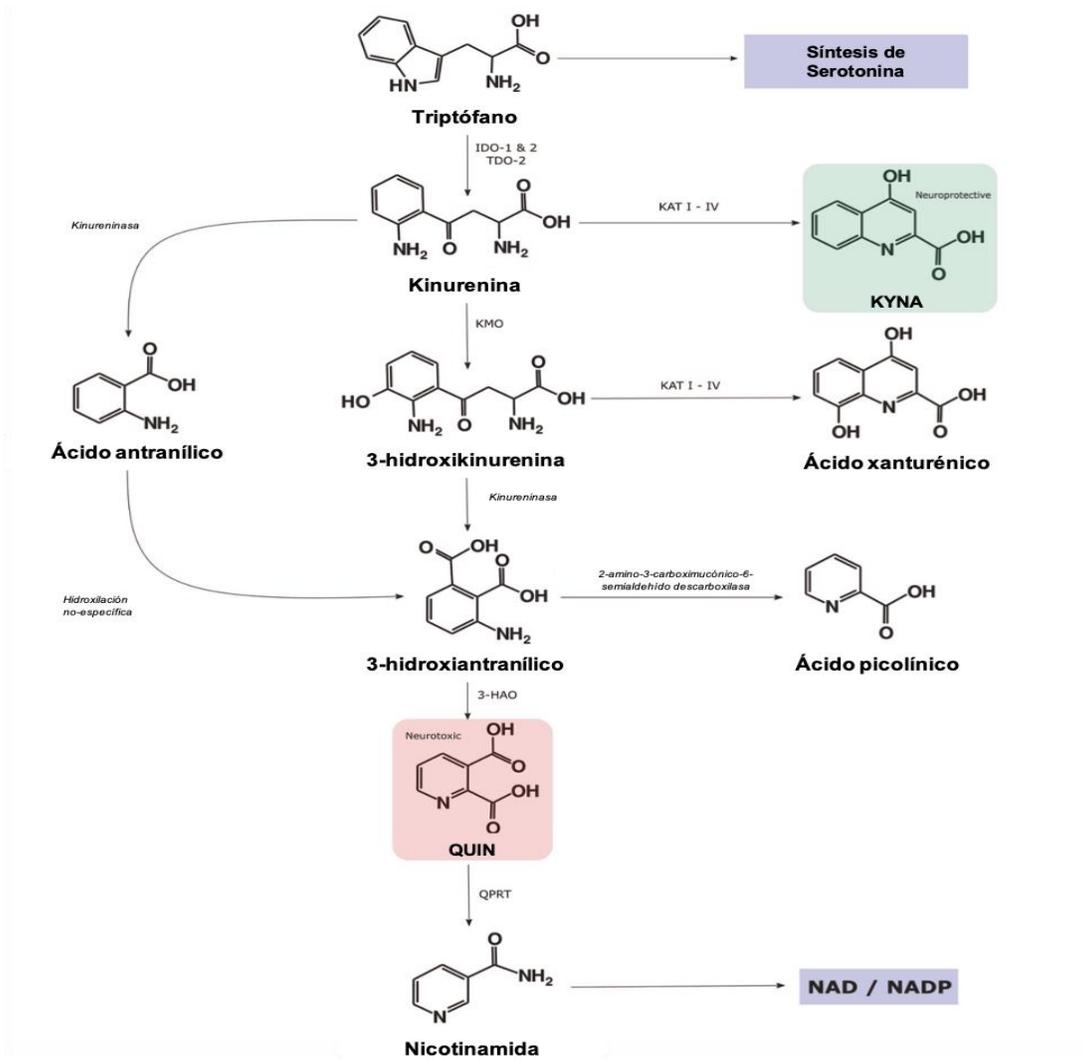


Figura 1. Vía de las kinureninas. Modificado de: Savitz, 2019, *Mol. Psychiatry*.

Por otro lado, es importante mencionar que en el SNC sólo el 40% de la producción de L-KYN -el precursor limitante de la vía- es producido localmente, mientras que el 60% restante proviene de la periferia y es aprovechado principalmente por las células gliales una vez que éste atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) (Vécsei *et al.*, 2013)

A nivel del SNC, la importancia de la VK radica en la dualidad de sus funciones; es por ello que a menudo para su descripción es dividida en dos ramas principales: la "neuroprotectora", cuando se dirige hacia la formación de KYNA y la "neurotóxica", cuando se produce QUIN (Amori *et al.*, 2009). De hecho, el cociente de concentración QUIN/KYNA ha mostrado guardar correlación con distintas enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos (Amori *et al.*, 2009). A partir del descubrimiento de la acción de estos metabolitos sobre la neurotransmisión colinérgica, glutamatérgica, dopaminérgica y gabaérgica diversos estudios se han enfocado en el desarrollo de fármacos, principalmente inhibidores enzimáticos, que permitan la modulación de sus niveles (Dijkman, 2010; Lovelace *et al.*, 2017; Schwarcz *et al.*, 2012; Stone & Darlington, 2002).

La evidencia que existe acerca de los mecanismos endógenos de regulación de la vía, en especial, sobre la producción local de estos dos principales metabolitos es limitada. Además, la investigación en torno a estos mecanismos a nivel del SNC casi siempre se deriva de estudios en contextos patológicos; por lo que, los mecanismos de regulación que suceden en condiciones normales no han sido esclarecidos. Dado el perfil neuroactivo de varias de las kinureninas que conforman la vía, la regulación de sus niveles en el SNC ha sido sugerida como un posible blanco de intervención farmacológica. Sin embargo, para dilucidar estos mecanismos, es necesario centrarnos en cada una de las ramas de la vía por separado; dada la importancia fisiológica ampliamente reportada para KYNA, el enfoque de este proyecto se dirige específicamente en este metabolito.

1.2 ÁCIDO KINURÉNICO

KYNA fue uno de los primeros metabolitos de la VK en ser descritos; su importancia fisiológica radica en su capacidad para actuar como antagonista de receptores ionotrópicos (IC_{50} : 0.01-400 μ M) involucrados en procesos de neurotransmisión esenciales para el proceso cognitivo (Perkins & Stone, 1982; Stone, 1993; Stone & Darlington, 2013).

1.2.1 VÍAS DE SÍNTESIS DE KYNA

1.2.2 VÍA CANÓNICA DE FORMACIÓN DE KYNA POR LAS KATs

El KYNA en cerebro es sintetizado en los astrocitos a partir de L-kinurenina principalmente proveniente del torrente sanguíneo y liberado rápidamente hacia el medio extracelular mediante los transportadores de aniones orgánicos OAT1 y OAT 3 (Swartz *et al.*, 1990; Fülöp *et al.*, 2009; Uwai *et al.*, 2012). La transformación de kinurenina a KYNA es principalmente atribuida a la transaminación irreversible de este precursor por acción de las enzimas KAT I y II, localizadas preferencialmente en las células gliales (Guidetti *et al.*, 1997; Pellicciari *et al.*, 2008). En SNC es la isoforma KAT II la principal enzima responsable de esta reacción dado que su pH óptimo se encuentra dentro del rango fisiológico (pH 7.4) a diferencia de la KAT I (pH 9.6) (Guidetti *et al.*, 1997). Ambas enzimas poseen una baja afinidad por su sustrato (1mM) en comparación a la KMO quien posee el valor más bajo de K_m (78 μ M) y con ello mayor afinidad por la kinurenina dirigiendo así la VK hacia la formación de NAD⁺ (Han *et al.*, 2009; Kiss *et al.*, 2003; Passera *et al.*, 2011) por lo que en esta ruta de formación, la tasa de síntesis de KYNA está regulada por la disponibilidad de kinurenina.

LA VÍA CANÓNICA DE FORMACIÓN DE KYNA OCURRE EN ASTROCITOS

Dada la baja permeabilidad de KYNA para atravesar la BHE, éste debe producirse localmente en el SNC (figura 2). Los astrocitos expresan de manera predominante a la enzima KATII aunque también se encuentra presente la isoforma KATI. Desde su caracterización, se observó que KATII se distribuye en el citosol de las células astrocíticas con proximidad a las sinapsis glutamatérgicas (Gramsbergen *et al.*, 1997; Moroni *et al.*, 2012; Schwarcz *et al.*, 2012) (figura 2); sin embargo, datos recientes han evidenciado que también se localiza en mitocondria, membrana plasmática, peroxisomas y núcleo (Gosker *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020; Tarasov *et al.*, 2020; Tanaka *et al.*, 2020).

Para la síntesis de KYNA, L-KYN es internalizado en astrocitos a través del transportador de aminoácidos neutros independiente de Na⁺, mientras que su liberación y formación disminuye en presencia de estímulos despolarizantes como concentraciones elevadas de K⁺, agonistas de receptores de glutamato (Glu) o bajo condiciones hipoglucémicas (Gramsbergen *et al.*, 1997; Schwarcz *et al.*, 2012b) (figura 2).

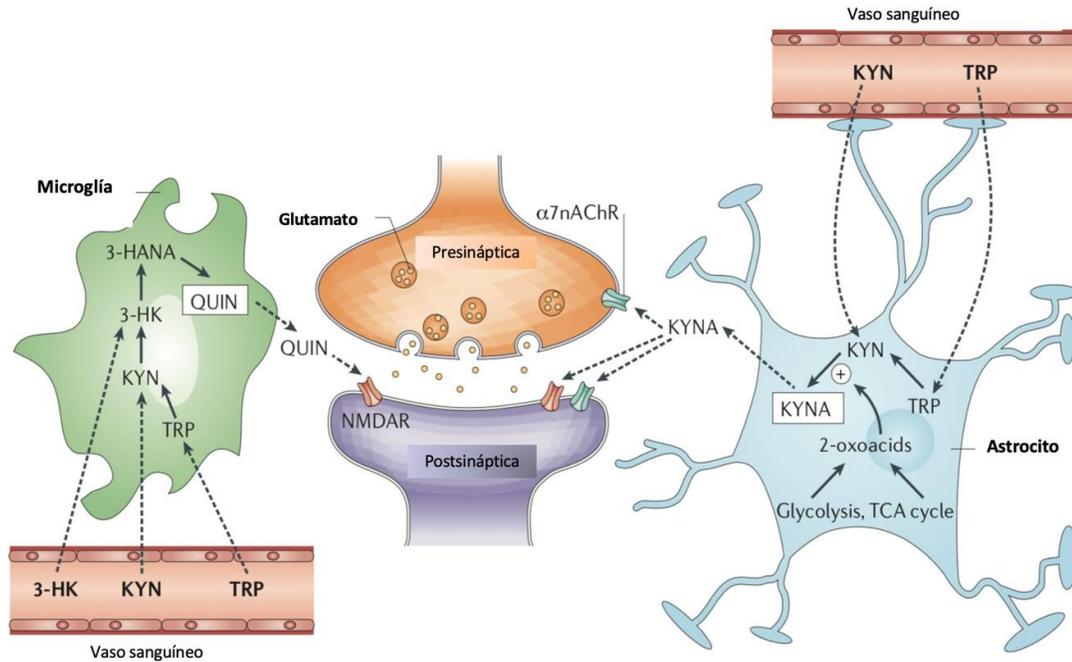


Figura 2. Compartimentalización celular de la vía de las kinureninas en el SNC: Producción de KYNA en astrocitos y QUIN en microglía. El metabolismo de la vía puede iniciar a partir del triptófano (TRP), el precursor kinurenina (KYN) o la 3-hidroxi-kinurenina (3-HK) provenientes directamente del torrente sanguíneo; o bien, estas dos últimas producidas localmente dentro del cerebro. Las dos ramas de la vía están físicamente segregadas. Los astrocitos albergan a las kinureninas aminotransferasas (KATs) pero no contienen a la kinurenina-3-monooxigenasa (KMO), por lo tanto, no pueden producir 3-HK pero sí KYNA. 3-HK y los metabolitos subsecuentes en esta rama son sintetizados principalmente en la microglía o en otras células de origen monocítico. Una vez sintetizadas dentro de las células gliales, QUIN y KYNA son liberados rápidamente al medio extracelular para incidir directamente en las terminales neuronales a nivel pre- y postsináptico en los receptores tipo NMDA y $\alpha 7nAChR$. Modificado de: Schwarcz *et al.*, 2012. *Nat. Rev Neurosc.*

1.2.3 VÍA ALTERNATIVA DE FORMACIÓN DE KYNA POR ERO/ERN

Existe evidencia que apoya la interacción directa entre las especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ERO/ERN) y derivados indólicos especialmente aquellos con sustituciones alifáticas en la posición 3-, como ocurre en específico con el Trp (Peyrot & Ducrocq, 2008). Politi en 1991, describe una ruta alternativa de formación de KYNA en la que, una vez ocurrida la transaminación oxidativa del Trp, el derivado indol-3-pirúvico resultante es oxidado por ERO dando lugar a un intermediario inestable que sufre ciclización espontánea y forma KYNA (Politi *et al.*, 1991).

Por otro lado, Zsizsik & Hardeland en 2002 demuestran que la producción de KYNA a partir de L-KYN en homogenados de *Lingulodinium polyedrum*, incrementa considerablemente en presencia de paraquat (aceptor de e^- y formador de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)) y carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP; generador de H_2O_2 y desacoplante de la fosforilación oxidativa), el incremento oscila entre el 53% para el primero y 65% para el segundo, respecto a los controles (Zsizsik & Hardeland, 2002). La interacción directa ERO/ ERN con los derivados del Trp se ve reflejada en su eficiencia como atrapadores de radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y radicales peroxilo (ROO^{\cdot}), ello favorece su propia oxidación y la interacción con otros radicales y ERO como $O_2^{\cdot-}$, radical óxido nítrico (ON^{\cdot}) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (Lugo-Huitrón *et al.*, 2008). Además, es importante mencionar que a pH fisiológicos y una baja concentración de dióxido de carbono (CO_2), el $ONOO^-$ reacciona con el *N*-acetil-Trp, produciendo principalmente kinureninas y derivados 1-nitrosos (González-Esquivel *et al.*, 2017; Peyrot & Ducrocq, 2008; Reyes-Ocampo *et al.*, 2014). Adicionalmente, en 2015 resultados de nuestro grupo de laboratorio comprobaron un incremento significativo en la formación de KYNA a partir de D-KYN y L-KYN en presencia de $ONOO^-$. En los experimentos *in vitro* se observó que el tratamiento con $ONOO^-$ de homogenados de cerebelo incrementa en ~ 286.14% los niveles de KYNA usando L-KYN como sustrato y 282.38% a partir de D-KYN. Experimentos de microdiálisis *in vivo* mostraron que la infusión de peroxinitrito en cerebelo de rata incrementa los niveles de KYNA en ~ 285.63% a partir de L-KYN y ~ 151.9% a partir de D-KYN (Blanco Ayala *et al.*, 2015).

1.3 PROPIEDADES DE KYNA

1.3.1 PROPIEDADES NEUROMODULADORAS

KYNA puede actuar selectivamente como antagonista competitivo en los receptores N-metil-D-aspartato (rNMDA) para Glu (uniéndose al sitio para Glu: IC_{50} 300 μ M o en el sitio co-agonista para glicina: IC_{50} 10-30 μ M), sin embargo, a concentraciones fisiológicas (50–100 nM) (Moroni *et al.*, 2012) resulta más eficiente como bloqueador no competitivo para el receptor α -7-nicotínico (α 7nACh, IC_{50} 1-8 μ M) (Hilmas *et al.*, 2001; Trevor W. Stone & Darlington, 2013) (figura 2). KYNA ejerce acciones anticonvulsivas y antiexcitotóxicas (Fujigaki *et al.*, 2017; Varnier *et al.*, 1999; Viu *et al.*, 1998), estas propiedades neuroprotectoras se le atribuyen principalmente a su antagonismo sobre los receptores para aminoácidos excitadores. Reportes en estriado sugieren que el incremento en los niveles de KYNA resulta en una marcada reducción de los niveles de Glu (Amori *et al.*, 2009; Pocivavsek *et al.*, 2011), este efecto se ha atribuido a un mecanismo dependiente de los α 7nACh, provocando posteriormente un descenso en los niveles extracelulares de dopamina (DA) (Amori *et al.*, 2009); esto sugiere un rol importante tanto en la transmisión glutamatérgica como en la dopaminérgica.

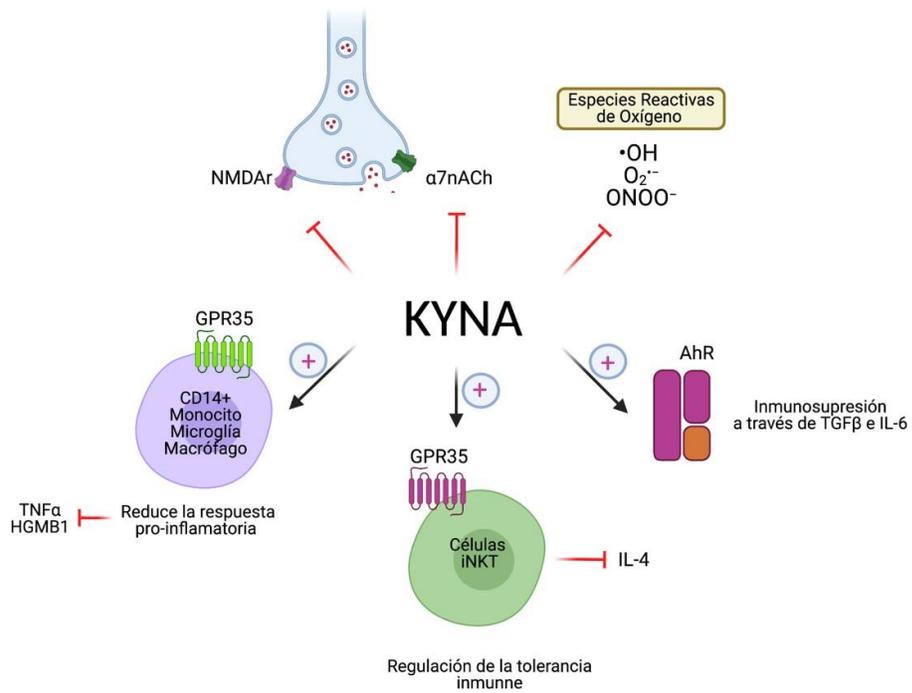


Figura 3. Principales blancos celulares y moleculares de KYNA. KYNA actúa como antagonista de los receptores NMDA y $\alpha 7nACh$ incidiendo así en la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica. Además, es ligando del receptor GPR35 presente en monocitos, macrófagos y células gliales; la interacción de KYNA con GPR35 en estas células reduce la respuesta pro-inflamatoria inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) a través de reducir los niveles de TNF- α y de la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1). Particularmente en monocitos, se ha sugerido que la interacción KYNA-GPR35 favorece su infiltración al SNC. La interacción de KYNA con AhR tiene un papel relevante en el mantenimiento de un microambiente inmunosuprimido en distintos tipos de cáncer probablemente a través de la supresión de la respuesta mediada por las células T reguladoras a través de TGF β e IL-6. Creado con *BioRender.com*

1.3.2 PROPIEDADES REDOX

KYNA también ha mostrado propiedades antioxidantes al ser un eficiente atrapador de radicales libres (RL) y ERO. Evidencia obtenida a través de ensayos de química combinatoria (sin tejido, sólo la combinación de la ERO/RL y KYNA en buffer fisiológico) han demostrado que KYNA puede actuar como atrapador de $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} y $ONOO^-$ (Christen *et al.*, 1990; Goda *et al.*, 1999; Lugo-Huitrón *et al.*, 2008; Pérez-González *et al.*, 2015; Poeggeler *et al.*, 1999) (Figura 3, Tabla 1).

En paralelo, análisis cinéticos computacionales predicen que KYNA es 24 veces más eficiente que el antioxidante Trolox para atrapar el radical hidroperoxilo ($\cdot OOH$) (Pérez-González *et al.*, 2015). Se ha propuesto que el mecanismo mediante el cual KYNA puede ejercer estas propiedades atrapadoras es a través de su propia autooxidación y así dar lugar al atrapamiento de dos $\cdot OH$ y $O_2^{\cdot-}$ para dar lugar a 2-hidroxicromanona y al óxido nítrico (ON) (Giles *et al.*, 2003; Poeggeler *et al.*, 1999; Zsizsik & Hardeland, 2002) (figura 3, Tabla 1). Aunado a estas observaciones, Giles y colaboradores han mostrado resultados obtenidos a través del análisis del perfil redox de KYNA que sugieren que puede actuar como un agente reductor *in vivo* capaz de ceder electrones y de este modo ejercer un control del ambiente redox celular (Giles *et al.*, 2003).

Tabla 1. Acciones de KYNA sobre receptores y ERO/ERN.

Receptor	Sitio de unión	Acción	EC ₅₀ (μM)	Referencias
AMPA/NMDA/Kainato	Glutamato	Antagonismo (competitivo)	100-400	<i>Perkins and Stone (1982)</i> <i>and Ganong et al. (1983)</i>
NMDA	Glutamato	Antagonismo (competitivo)	10-30	<i>Birch et al. (1988)</i> and <i>Kessler et al. (1989)</i>
Autoreceptor NMDA	Glutamato/ glicina	Antagonismo (competitivo)	0.01-1	<i>Luccini, Musante, Neri, Raiteri, and Pittaluga (2007)</i>
α7nAChR	Sitio de potenciación alostérica	Antagonismo (no-competitivo)	1-8	<i>Hilmas et al. (2001)</i>
AMPA	Glutamato	Agonismo	10	<i>Prescott, Weeks, Staley, and Partin (2006)</i>
GPR35	Desconocido	Agonismo	0.1-30	<i>Wang et al. (2006)</i>
AhR	Desconocido	Agonismo	1-2	<i>DiNatale et al. (2010)</i>

Capacidad atrapadora de Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno		
ERO / ERN	IC ₅₀ (μM)	Referencia
•OH	209.0 ± 7.4	<i>Lugo-Huitrón et al. (2011), Hardeland & Zsizsik (1999) (2001)</i>
O ₂ ^{•-}	212.3 ± 11.4	
ONOO ⁻	598.4 ± 74.8	

MODIFICADO DE (POCIVAVSEK ET AL., 2016). CAPÍTULO EN HANDBOOK OF BEHAVIORAL NEUROSCIENCE

1.4 KYNA EN COGNICIÓN

La VK y las kinureninas que produce tienen una compleja relación con el proceso cognitivo, especialmente en contextos patológicos como aquellos presentes en desórdenes psiquiátricos o enfermedades neurodegenerativas. Las fluctuaciones en estos metabolitos -que implican tanto el incremento como la disminución de estos- han sido relacionadas con un desempeño cognitivo deficiente.

Particularmente, las fluctuaciones de KYNA han demostrado tener un efecto importante sobre las concentraciones y la liberación de los neurotransmisores tales como Glu, DA y ácido γ -aminobutírico (GABA). Experimentalmente, se ha comprobado que la administración local de concentraciones nanomolares de KYNA en cerebros de roedores, o bien, su estimulación a través de la administración sistémica de su precursor kinurenina o a través de la inhibición sistémica de KMO (la enzima responsable de dirigir la vía a la producción de QUIN y NAD^+) resulta sistemáticamente en una reducción substancial (30-50%) en los niveles extracelulares de Glu en distintas áreas cerebrales incluyendo al estriado, el hipocampo y la corteza prefrontal (Schwarcz, 2016; Wonodi *et al.*, 2011). De manera contraria, cuando la síntesis de KYNA es reducida a través de la aplicación local de un inhibidor de KATII (la enzima principal para su biosíntesis) los niveles de Glu incrementan rápidamente. La especificidad de este fenómeno se comprobó en este mismo contexto mediante la co-administración de KYNA la cual neutralizó el efecto de la inhibición de KATII sobre los niveles de Glu (Konradsson-Geuken *et al.*, 2010; Pocivavsek *et al.*, 2011a; Wu *et al.*, 2010).

Las fluctuaciones en los niveles de KYNA, principalmente mediante manipulación farmacológica, han demostrado no sólo afectar a los niveles de Glu sino también tener efectos muy similares cuantitativa y cualitativamente sobre los niveles de DA (Rassoulpour, Wu, Ferre, & Schwarcz, 2005), GABA (Beggiato *et al.*, 2013, 2014) y acetilcolina (Zmarowski *et al.*, 2009) (Tabla 2). En roedores adultos, la estimulación de la síntesis de KYNA (mediante la administración de su precursor kinurenina) provoca un incremento de sus niveles cerebrales endógenos que parten desde concentraciones nanomolares a micromolares; esta elevación en KYNA se traduce en un amplio espectro de déficits cognitivos que tienen el potencial de ser traducidos al contexto humano. Existe una evidencia experimental robusta acerca de las afectaciones que provoca la elevación -incluso transitoria- de KYNA en el desempeño cognitivo de roedores en modelos distintos. La manipulación farmacológica de KYNA se logra fácilmente con la administración del precursor kinurenina que induce un rápido y consistente incremento en los niveles de KYNA cerebrales. La administración aguda de kinurenina (100 mg/kg, i.p.) eleva los niveles cerebrales de KYNA, alrededor de 37 veces con respecto a sus niveles basales; es decir, que una sola administración de kinurenina incrementa los niveles de KYNA a concentraciones micromolares ($\sim 0.5 \mu\text{M}$) (Chess *et al.*, 2009). Estos incrementos moderados de KYNA son suficientes para inducir alteraciones en el sistema sensorial auditivo (Shepard *et al.*, 2003) incluyendo al mecanismo denominado inhibición previa al pulso (Erhardt *et al.*, 2004) además, son capaces de inducir alteraciones en la flexibilidad cognitiva mediada por la corteza prefrontal (Alexander *et al.*, 2012), en la

memoria y aprendizaje contextual mediada por el hipocampo (Pocivavsek *et al.*, 2011) así como en la memoria de trabajo y memoria en un paradigma de miedocontextual (Chess *et al.*, 2009; Chess *et al.*, 2007; Vunck *et al.*, 2020). La mayoría de estas alteraciones han sido atribuidas indirecta o directamente a la acción inhibitoria que KYNA ejerce sobre los receptores $\alpha 7nACh$, ya que varias de estas alteraciones son neutralizadas al administrar un agonista para estos mismos receptores (Alexander *et al.*, 2012; Vunck *et al.*, 2020). Adicionalmente, respaldando la existencia de una relación funcional entre KYNA y los procesos cognitivos, se ha documentado que los roedores deficientes de la enzima KMO caracterizados por presentar niveles elevados de KYNA en cerebro presentan ansiedad y déficits en la memoria contextual (Giorgini *et al.*, 2013). Se ha sugerido, que estas alteraciones podrían estar relacionadas con una disfunción de la neurotransmisión dopaminérgica.

Por otro lado, la disminución en los niveles cerebrales de KYNA ha sido asociada a efectos pro-cognitivos. Por ejemplo, los ratones nulos para la enzima KATII presentan un mejor desempeño en un variado número de evaluaciones cognitivas que incluyen distintos paradigmas conductuales (exploración y reconocimiento de objeto novedoso, evaluación de evitación pasiva y discriminación espacial) en donde se evaluó principalmente la memoria contextual y espacial; procesos cognitivos dependientes en gran medida del circuito mediado por hipocampo (Potter *et al.*, 2010). Adicionalmente, se caracterizó que estos ratones presentan niveles elevados de DA extracelular en estriado (Wu *et al.*, 2007) y un incremento en los niveles de Glu en el hipocampo. En conjunto, estos estudios han establecido las bases

para establecer una relación causal entre la reducción de los niveles de KYNA y un mejor desempeño cognitivo, así como un amplio espectro de déficits cognitivos cuando estos niveles están incrementados. De tal manera que KYNA funciona como un neuromodulador bidireccional en el SNC.

Tabla 2. Administración prolongada de Kinurenina: Efectos conductuales y cognitivos.

Tipo de administración	Edad de manipulación	Edad de evaluación	Paradigma conductual	Resultado	Especie	Ref.
Mezclado en la comida (100 mg/ día)	ED15-22	PD56	Aprendizaje espacial y memoria de referencia	Déficit	Rata	Pocivavsek, Thomas, et al. (2014)
			Aprendizaje contextual por evitación-pasiva	Déficit		
Mezclado en la comida (100 mg/ día)	ED15-22	PD56	Prueba de atención por cambio de set	Déficit	Rata	Pershing et al. (2015)
Mezclado en la comida (100 mg/ día)	ED15-22	PD35	Memoria de miedo condicionado contextual	Sin efecto	Rata	Pershing et al. (2014)
		PD56		Déficit		
Mezclado en la comida (100 mg/ día)	ED15-22	PD56	Memoria de trabajo Demora en no-coincidir con la posición inicial	Déficit	Rata	Vunck, Phenis, Tseng, Schwarcz, and Bruno (2014)
Mezclado en la comida (100 mg/ día)	ED15-22	PD56	Memoria espacial y de referencia	Déficit	Rata	Pocivavsek et al. (2012)
			Aprendizaje contextual por evitación-pasiva			
Mezclado en la comida (100 mg/ día)	ED15-21	PD56	Prueba de atención por cambio de set	Déficit	Rata	Alexander et al. (2013)
IP (100 mg/kg)	PD7-10	PD70	Comportamiento Social	Déficit	Rata	Iaccarino et al. (2013)
IP (100 mg/kg)	PD7-16	PD90	Actividad locomotora inducida por anfetamina	Déficit	Ratón	Liu et al. (2014)
IP (100 mg/kg)	PD27-35	PD61	Comportamiento Social	Déficit	Rata	Trecartin and Bucci (2011)
		PD61		PD84		
IP (100 mg/kg)	PD27-35	PD61	Memoria de reconocimiento de objeto novedoso	Déficit	Rata	Akagbosu et al. (2012)
			Memoria contextual por condicionamiento al miedo	Déficit		
			Condicionamiento al miedo después de una señal específica	Sin efecto		
IP (100 mg/kg)	PD27-35	PD61	Valor motivacional mediante seguimiento de señales	Incremento	Rata	DeAngeli et al. (2015)
Mezclado en la comida (100 mg/día)	PD42-49	PD85	Aprendizaje espacial y memoria de referencia	Sin efecto	Rata	Pocivavsek, Thomas, et al. (2014)
			Aprendizaje contextual por evitación-pasiva	Sin efecto		
IP (20 mg/kg/ día)	Adulto	Adulto	Inhibición de pre-pulso	Déficit	Rata	Nilsson, Linderholm, and Erhardt (2006)
IP (100 mg/kg)	Adulto	Adulto	Actividad locomotora inducida por anfetamina	Déficit	Ratón	Olsson, Larsson, and Erhardt (2012)

ED: Etapa de desarrollo embrionario; PD: Día postnatal; IP: Intraperitoneal. Modificado de Pocivavsek et al., 2016. Capítulo en Handbook of Behavioral Neuroscience.

1.5 IMPORTANCIA DE KYNA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y DESÓRDENES PSIQUIÁTRICOS

Dada su acción sobre los receptores NMDA y $\alpha 7nACh$, y a su capacidad como atrapador de RL y ERO, las variaciones en los niveles de KYNA se han ligado a distintas patologías y enfermedades neurodegenerativas (Moroni *et al.*, 2012; Potter *et al.*, 2010; Raju *et al.*, 2007; Réus *et al.*, 2015; Vamos *et al.*, 2009).

Un aumento en los niveles de KYNA ha sido asociado con efectos antiepilépticos (Erhardt *et al.*, 2007; Foster, Vezzani *et al.*, 1984; Rózsa *et al.*, 2008), alteraciones cognitivas (Koola, 2016; Pocivavsek *et al.*, 2011), psicosis y esquizofrenia (Dijkman, 2010; Erhardt *et al.*, 2003; Erhardt *et al.*, 2007; Iaccarino *et al.*, 2013; Koola, 2016), Alzheimer (Lovelace *et al.*, 2017; Moroni *et al.*, 2012), así como a Esclerosis Lateral Amiotrófica (Watzlawik *et al.*, 2016). Mientras que, un descenso en los niveles de KYNA ha sido reportado en enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson y Huntington (Pérez-DeLa Cruz *et al.*, 2007; Vécsei *et al.*, 2013; Zádori *et al.*, Vécsei, 2011). Por ejemplo, en la enfermedad de Huntington (EH), los niveles de KYNA son prácticamente nulos en el núcleo caudado resultado de la reducida actividad de KAT I y II en el estriado de cerebros de pacientes con esta enfermedad. La reducción de la actividad de las KATs aunado a la incrementada actividad de la IDO/TDO en pacientes con EH dirige la VK hacia la formación de QUIN dando lugar a eventos de estrés oxidante y excitotoxicidad (Stone & Darlington, 2013).

En etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer, los niveles de KYNA, así como la expresión de las KATs han demostrado una tendencia a incrementarse como respuesta de compensación por los altos niveles de QUIN (Baran *et al.*, 1999). Por otro lado, también se ha demostrado que a medida que la enfermedad progresa, los niveles de KYNA disminuyen, ya que se ha sugerido que la formación de KYNA depende del metabolismo energético, mismo que se encuentra alterado en las etapas tardías de la EA; lo que explicaría los cambios en los niveles de KYNA conforme al progreso de la enfermedad (Baran *et al.*, 1999). En el caso de la enfermedad de Parkinson, los niveles incrementados de 3-HK, ponen de manifiesto la tendencia de la VK en esta patología a favorecer la síntesis de 3-HK a partir de L-KYN sobre la de KYNA, característica que a su vez, puede ser responsable de la susceptibilidad que presentan las neuronas de estos de estos pacientes al daño oxidativo (Zinger *et al.*, 2011).

Finalmente, en la esquizofrenia (Figura 4), en donde la reducción de la actividad de los receptores tipo NMDA es una de las características más recurrentes, se ha reportado un incremento en los niveles de KYNA tanto en líquido cefalorraquídeo como en tejidos cerebrales *post mortem* (corteza cingular y frontal) de pacientes; además de una reducción en la actividad de la KMO, la enzima encargada de dirigir la VK hacia la formación de QUIN, de tal modo que la síntesis de KYNA limitada por la afinidad y la disponibilidad por L-KYN es favorecida (Schwarcz *et al.*, 2012 Schwarcz, 2016;). Adicionalmente, las alteraciones en los niveles de Glu, DA y acetilcolina (Ach) que son de la esquizofrenia podrían también ser explicadas por la acción de KYNA sobre los receptores α -7-nicotínicos (Erhardt *et al.*, 2003; Erhardt *et al.*, 2007; Schwarcz *et al.*, 2012)

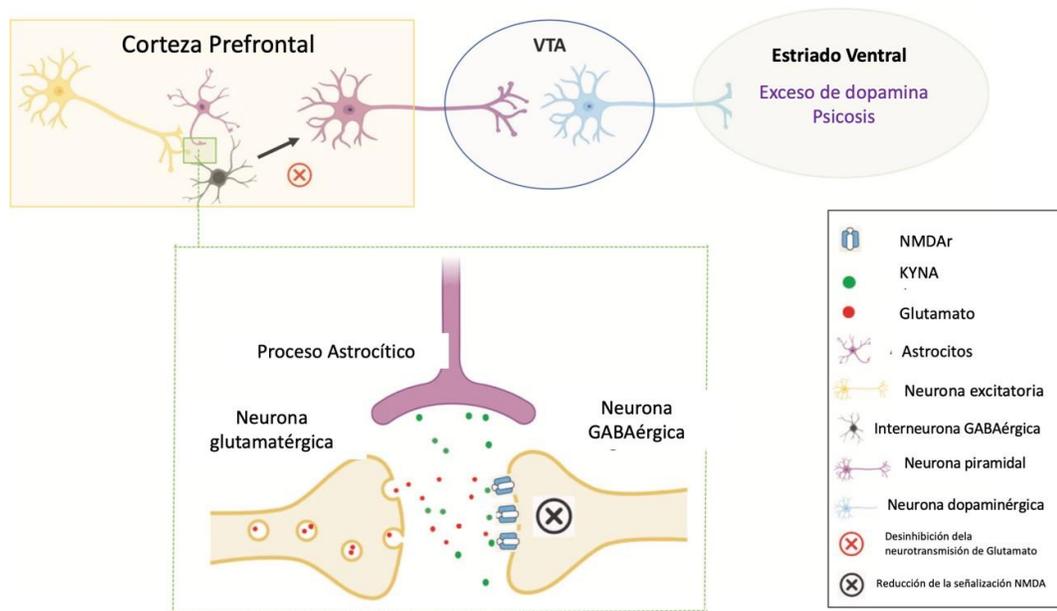


Figura 4. Modelo simplificado de la psicosis inducida por KYNA. Las interneuronas corticales GABAérgicas normalmente ejercen un tono inhibitorio en las neuronas piramidales glutamatergicas que proyectan al área ventral tegmental (VTA) y modulan la neurotransmisión dopaminérgica. La producción excesiva de KYNA en astrocitos puede causar la hipofunción del receptor NMDA en las interneuronas corticales GABAérgicas, provocando una reducción en la neurotransmisión GABAérgica así como la desinhibición de las proyecciones glutamatergicas corticales. Teóricamente, esta actividad glutamatergica anormalmente incrementada provoca la sobreactivación de la vía dopaminérgica mesolímbica y la liberación excesiva de dopamina en el estriado ventral, finalmente dando lugar al desarrollo de eventos psicóticos. Modificado de: Savitz, 2019, *Mol. Psychiatry*.

1.6 SISTEMAS ANTIOXIDANTES: POTENCIALES REGULADORES DE LA VÍA ALTERNATIVA DE FORMACIÓN DE KYNA POR INTERACCIÓN DIRECTA CON ERO/ERN

La cantidad excesiva de ERO/ERN o radicales libres necesita ser controlada a través de su conversión a moléculas inocuas o bien, atrapándolas justo después de su formación. El conjunto de estos mecanismos protectores constituye el sistema de defensa antioxidante cuyo objetivo es prevenir el daño celular por RL y ER que pueden estar relacionadas con enfermedades neurodegenerativas y en general, a las características propias del envejecimiento.

El objetivo principal de los sistemas antioxidantes es entonces, mantener la homeostasis redox en el organismo.

Dentro de los sistemas antioxidantes endógenos, destacan la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, aldehído deshidrogenasa y sulfiredoxina, todos pertenecientes a la clase de sistemas antioxidantes enzimáticos; por otra parte encontramos al glutatión (GSH) dentro de los sistemas antioxidantes endógenos no enzimáticos y el cual representa la defensa antioxidante más importante en el SNC (Birben *et al*, 2012).

1.6.1 SISTEMA ANTIOXIDANTE GLUTATIÓN

El sistema antioxidante glutatión está constituido básicamente por la forma reducida de glutatión (GSH), la enzima glutatión reductasa, encargada de mantener el estado reducido de GSH una vez que éste ha sido oxidado, y la glutatión peroxidasa, encargada de eliminar peróxidos usando como agente reductor a GSH. El GSH es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína (Cys) y glicina (Gly)

, y es la fuente más abundante de tioles libres al interior de las células (Dringen, 1999). Su síntesis implica la unión de estos aminoácidos y comienza con la acción de la γ -glutamil-cisteína sintetasa ó γ -glutamil-cisteína ligasa (GCL) que cataliza la formación de γ -glutamil-cisteína utilizando a Glu y Cys como sustratos. Posteriormente, la γ -glutamil-cisteína es unida a glicina por la acción de la glutatión sintetasa, ambas reacciones son dependientes de ATP (Dringen, 1999). La concentración intracelular de GSH es regulada de manera autocrina a través de la inhibición de la GCL por el producto final GSH, así se garantiza un equilibrio entre su síntesis y su

consumo (Kranich *et al.*, 1998).

Además de su función como antioxidante, el GSH participa en los procesos de detoxificación de xenobióticos, es una forma de almacenamiento y transporte de Cys, participa como cofactor para reacciones de isomerización y juega un rol importante en la regulación de apoptosis y proliferación celular a través de la regulación que ejerce sobre los niveles de ERO intracelulares (Janáky *et al.*, 1999). Como respuesta a altas concentraciones de ERO/ERN, GSH puede unirse de manera reversible a los grupos tiol presentes en las cisteínas de algunas proteínas sensibles a cambios redox (Janáky *et al.*, 1999). En condiciones de estrés oxidante, los niveles de proteínas S-glutationiladas son al menos un orden de magnitud mayor a los niveles basales en condiciones normales. Esta modificación puede ser espontánea o catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST), y puede tener consecuencias tanto de activación como de inhibición sobre proteínas con alguna actividad enzimática (Dringen, 1999; Lushchak, 2012).

1.6.2 GSH EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La concentración intracelular de GSH en mamíferos es de 12 mM, sin embargo, en SNC se encuentra entre 1 y 3 mM. Se ha determinado que la concentración de GSH en cerebro es tejido-dependiente y que la mayoría está localizada en células no-neuronales (GSH glial 3.8 mM vs GSH neuronal 2.5 mM). Particularmente, los niveles de GSH durante distintos estadios de desarrollo en el SNC son substancialmente mayores en astrocitos con respecto a los oligodendrocitos (ej. 28 vs 12 nmol/mg proteína, respectivamente) y también con respecto a neuronas (16-50 nmol/mg de proteína vs 1-13 nmol/mg de proteína) (Dringen, 1999), asimismo, la tasa

de recambio de GSH sucede con mayor rapidez en astrocitos y es dependiente de la disponibilidad relativa de Glu y cisteína (Guo & Shaw, 1992b). Otra particularidad es que éstos son capaces de liberar tanto GSH como GSSG hacia el medio extracelular a través de las bombas resistentes a multi-fármacos (MDRPs) y hemicanales (60% y 100% del total de la exportación en SNC, respectivamente) controlando así activamente el estado redox cerebral. Finalmente, en el proceso de depuración de xenobióticos se ha observado que la formación de aductos por la acción de la enzima glutatión transferasa es más prominente en astrocitos que en neuronas (Guo *et al*, 1992a).

1.7 N-ACETILCISTEÍNA Y LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

N-acetilcisteína (NAC) es un fármaco ampliamente utilizado como antídoto para la intoxicación por acetaminofén (APAP, Tylenol, paracetamol). Es un fármaco seguro, con aprobación por la FDA y ampliamente comercializado en prácticamente todo el mundo. Su estructura química es sencillamente una cisteína (Cys) a la que se le ha adicionado un grupo acetilo (Figura 5). El aminoácido Cys resulta ser el factor limitante en la síntesis de glutatión; por esta razón, NAC es utilizado ampliamente como precursor para la síntesis de GSH (figura 5). Sin embargo, la actividad antioxidante *in vivo* de NAC puede deberse a por lo menos tres distintos mecanismos: 1) Efecto antioxidante directo sobre ERO y RL (Tabla 3), 2) Efecto antioxidante indirecto como resultado de su capacidad para actuar como precursor de Cys y favorecer la síntesis de GSH, que a su vez es sustrato para distintas

enzimas antioxidantes y 3) Un efecto de ruptura de disulfuros y la capacidad de restaurar las reservas de tioles, que a su vez regulan el estado redox (Aldini *et al.*,2018).

Una vez dentro del organismo, NAC es deacetilado y transformado a L-cistina la cual es rápidamente oxidada a cistina en el medio pro-oxidante del cerebro. Cistina es el sustrato del transportador antiporter cistina-Glu, el cual expulsa Glu fuera de la célula en intercambio por la cistina. Una vez dentro de la célula la cistina puede ser reducida a Cys y ser utilizada como sustrato por la GCL que catalizará la formación de γ -glutamyl-cisteína. Posteriormente la γ -glutamyl-cisteína es unida a Gly por la acción de la glutatión sintetasa para dar lugar a la formación de GSH (Berk *et al.*, 2013).

Tabla 3. Comparación de las constantes de velocidad de reacción de NAC, Cys, GSH y antioxidantes enzimáticos endógenos con las principales especies oxidantes.

Oxidante	Antioxidante	K (M ⁻¹ s ⁻¹)
H ₂ O ₂	NAC	0.16
	GSH	0.89
	Cys	2.9
	Peroxiredoxinas	1.4 x 10 ⁷
ONOOH	NAC	415 ± 10
	GSH	1360 ± 60
	Cys	4500
	Peroxiredoxinas	1 x 10 ⁶ - 1 x 10 ⁷
O ₂ ⁻	NAC	68
	GSH	200
	Cys	15
	Superóxido dismutasa	2.3 x 10 ⁹
OH [•]	NAC	1.36 x 10 ¹⁰
	GSH	1.64 x 10 ¹⁰
	Cys	5.35 ± 0.2 x 10 ⁹
	Ácido úrico	9.52 x 10 ⁹
HO(X)	NAC	0.29 ± 0.04 x 10 ⁸
	GSH	1.2 ± 0.2 x 10 ⁸
	Cys	3.6 ± 0.5 x 10 ⁸
NO ₂	NAC	1 x 10 ⁷
	GSH	2 x 10 ⁷
	Cys	6 x 10 ⁷

Modificado de: Aldini *et al.*, 2018. *Free Radic. Res.*

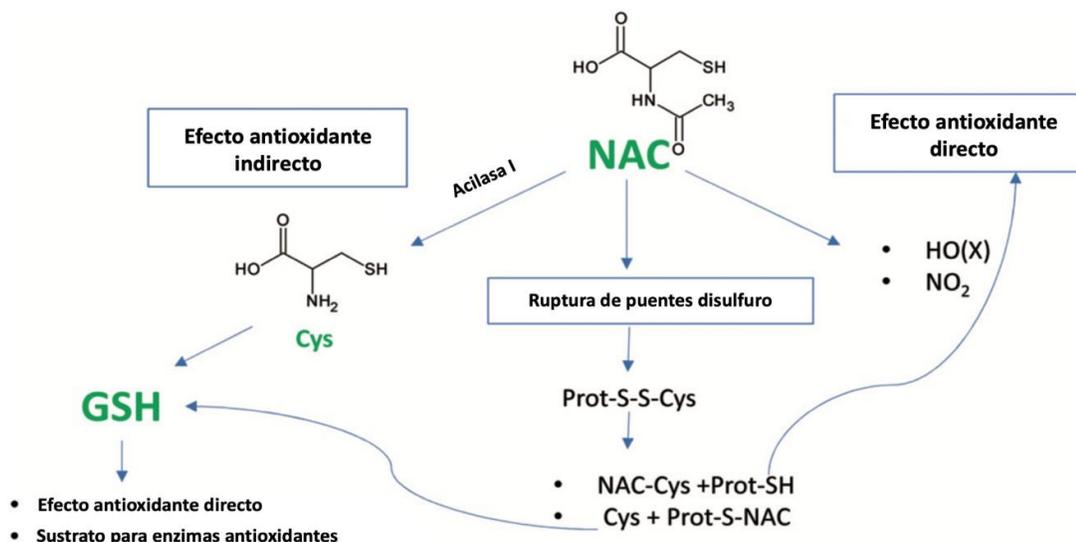


Figura 5. Acciones antioxidantes de NAC. El efecto antioxidante de NAC se atribuye indirectamente a la síntesis de GSH y de manera directa a través de su capacidad para romper puentes disulfuro. Cuando el estado de estrés oxidante agota las reservas de grupos tiol (SH), NAC puede actuar como atrapador directo de moléculas oxidantes como óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO₂). NAC rompe proteínas con alto contenido de grupos tiol, liberándolos, los cuales tienen una mejor actividad antioxidante como atrapadores que NAC, además de promover la síntesis de GSH y proteínas reducidas, tal es el caso de la proteína mercaptoalbúmina que tiene una actividad antioxidante directa. Modificado de: Aldini *et al.*, 2018. *Free Radic. Res.*

1.7.1 NAC EN DESÓRDENES NEUROLÓGICOS: MECANISMOS DE ACCIÓN Y OPORTUNIDADES TERAPEÚTICAS

Actualmente, hay extensa evidencia de las propiedades pro-cognitivas de NAC en distintos modelos animales experimentales. En el campo de psiquiatría el efecto de NAC ha sido probado en más de 20 ensayos clínicos como tratamiento adyuvante. Clínicamente, NAC ha mostrado buenos resultados en el tratamiento de la esquizofrenia, trastorno bipolar, autismo y depresión grave (Bavarsad Shahripour *et al.*, 2014).

Además de restaurar eficazmente los niveles cerebrales de GSH, especialmente en contextos patológicos en donde los niveles antioxidantes están reducidos; NAC presenta una gran variedad de mecanismos mediante los cuales ejerce sus efectos

neurobiológicos. Entre los mecanismos que se han descrito para NAC destacan: la estimulación de la neurogénesis, el bloqueo de la apoptosis, reducción de los marcadores pro-inflamatorios y de la toxicidad mitocondrial, además de modular los niveles de Glu (Berk *et al.*, 2013; Dean *et al.*, 2011). Particularmente, hay evidencia que apunta que NAC modula distintos sistemas de neurotransmisión implicados en un amplio rango de psicopatologías, incluyendo Glu y DA. En el caso de Glu, el sistema x(c) el transportador antiporte cisteína/glutamato -localizado principalmente en astrocitos- es un elemento clave en el control del Glu extracelular y en la regulación de retroalimentación de la liberación de glutamato. La administración de NAC activa al transportador Cys/ Glu aportando un grupo cisteína extra, en modelos de esquizofrenia mejora los déficits conductuales característicos y revierte las elevaciones en el Glu extracelular.

Adicionalmente, NAC también ha mostrado efectos benéficos en modelos de adicción a la cocaína, potencialmente a través de la estimulación del transportador Cys/ Glu, así como de la regulación de la señalización presináptica de los receptores glutamatérgicos mGluR2/3. Además de regular la liberación de glutamato por vía directa o a través de GSH, NAC tiene la capacidad de modular la actividad de los receptores NMDA a través de la unión directa al receptor o bien a través de la modulación del estado redox por GSH. Esta modulación redox es posible gracias a que su actividad depende de niveles subtóxicos de ERO, sin embargo, si éstos están elevados la actividad del receptor NMDA se ve afectada por la unión de las ERO en los sitios redox-sensibles de la proteína. El tratamiento con NAC

reduce los niveles de ERO directamente, o bien, de manera indirecta a través de la restauración de los niveles de GSH. Además de Glu, NAC puede regular la liberación de DA, este neurotransmisor es por sí mismo un pro-oxidante que estimula la formación de H_2O_2 y radicales libres a través de su autooxidación. En este contexto, NAC reduce el estrés oxidante inducido por metanfetamina, un fármaco usado para promover una fuerte liberación de DA y la apoptosis neuronal, y con ello previene la neurotoxicidad causada por la oxidación de DA y con ello la desregulación de la neurotransmisión dopaminérgica. Por otro lado, un mecanismo potencial de neuroprotección efectuado por NAC, por su naturaleza antioxidante, implica el mantenimiento o la restauración de la homeostasis redox celular. El cerebro es particularmente sensible a un desbalance redox debido a su alta tasa metabólica y alto consumo de oxígeno que produce constantemente ERO y radicales libres, aunado a su baja capacidad antioxidante comparada con otros órganos. Alteraciones en distintos marcadores de estrés oxidante incluyendo a las enzimas encargadas de la producción o la neutralización de las ERO y radicales libres se han descrito en déficits de hiperactividad, desorden bipolar, autismo, depresión y esquizofrenia. El tratamiento con NAC estimula la respuesta antioxidante y restablece la homeostasis redox en varias de estas patologías. Por otro lado, NAC promueve la neurogénesis de manera directa incrementando las neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) e indirectamente al reducir la apoptosis mediante el incremento de las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (figura 6).

NAC reduce la disfunción mitocondrial modificando la dinámica de Ca^{2+} al interior de las mitocondrias, disminuyendo el Ca^{2+} intracelular; con esto se reduce la toxicidad mitocondrial y esto a su vez reduce los niveles de ERO (figura 6).

NAC además puede actuar directamente neutralizando las ERO y radicales libres y con ello contribuyendo a la inhibición de la apoptosis (figura 6). Finalmente, NAC reduce la respuesta inflamatoria causada principalmente por alteraciones en la neurotransmisión aunado a la disfunción mitocondrial, a través de la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e interleucina 6 (figura 6).

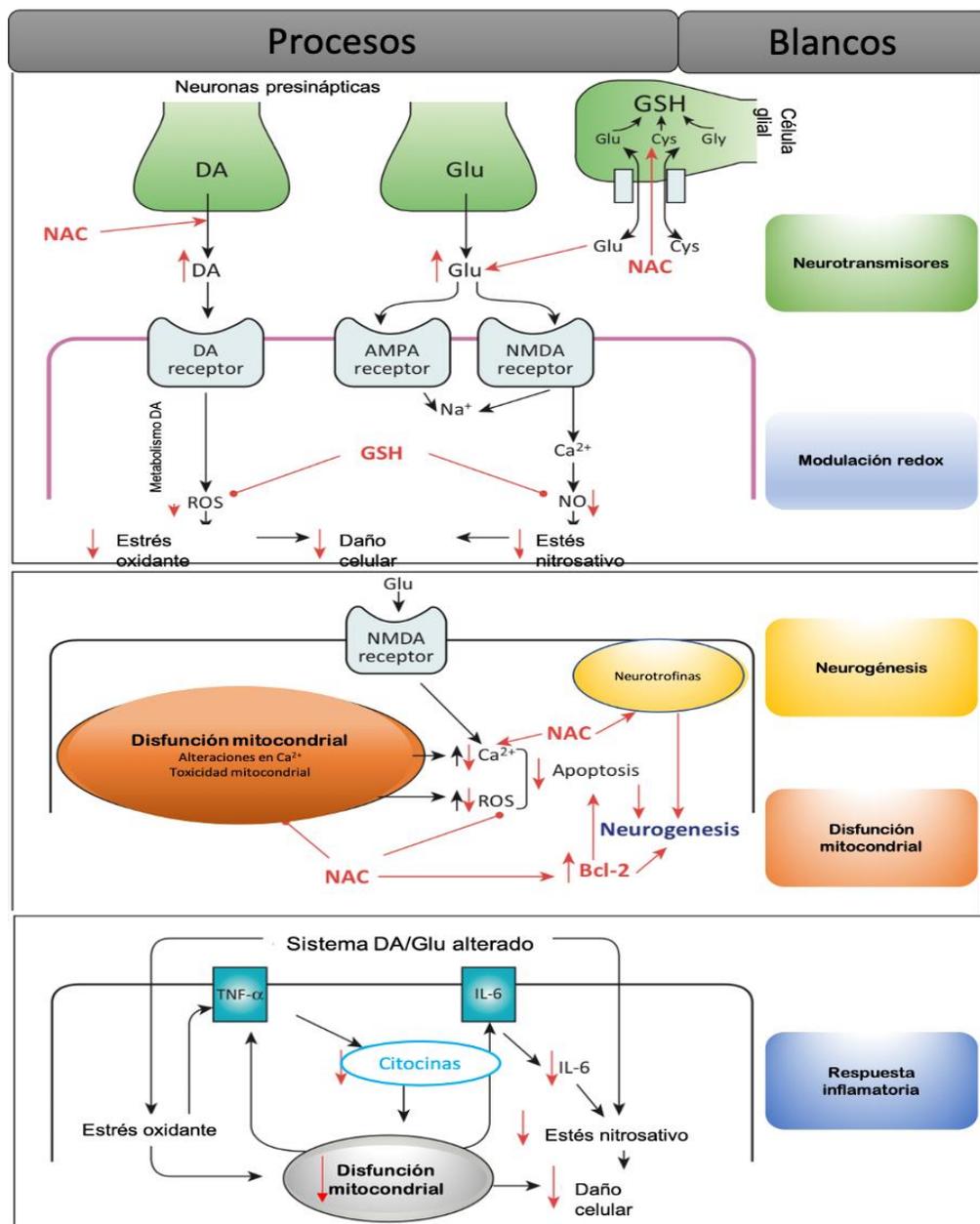


Figura 6. Blancos psicopatológicos de NAC. NAC actúa a distintos niveles dependiendo del contexto patológico: modula los niveles de neurotransmisores, el estado redox celular, estimula la neurogénesis, reduce la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria. Modificado de Berk *et al.*, 2013

2. JUSTIFICACIÓN

Existe una amplia evidencia de los efectos pro-cognitivos de NAC en un diverso rango de psicopatologías y enfermedades neurológicas. A la fecha, la mayoría de estos efectos han sido atribuidos al incremento en los niveles endógenos de GSH y la posterior liberación de glutamato; sin embargo, también se han considerado mecanismos alternativos de acción. Dada la probada función de las kinureninas y específicamente del KYNA en la modulación de distintos sistemas de neurotransmisión, incluyendo al mediado por glutamato, en el presente estudio exploramos la posibilidad de que los efectos farmacológicos de NAC puedan involucrar la modulación de los niveles cerebrales de KYNA y con ello sus efectos sobre la neurotransmisión y la función cognitiva con implicaciones de relevancia translacional.

3. HIPÓTESIS

En el SNC los mecanismos oxidantes involucrados en la producción de KYNA serán modulados por NAC mediante la promoción de la síntesis del precursor GSH que modificará los niveles cerebrales de KYNA en roedores.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del antioxidante, y precursor de glutatión, N-acetilcisteína sobre los niveles cerebrales de KYNA como posible mecanismo neuromodulador de los efectos pro-cognitivos atribuidos a este fármaco.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar la modificación de los niveles de KYNA -endógenos o por síntesis *de novo*- al inducir la síntesis de GSH mediante una administración aguda de NAC tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. Determinar la dependencia del efecto de NAC sobre los niveles cerebrales de KYNA con el incremento en la síntesis de GSH.
3. Dilucidar el efecto de NAC sobre la actividad enzimática de KATII de rata así como de la KATII recombinante humana.
4. Corroborar el efecto conductual y cognitivo de la modulación de los niveles de KYNA mediante un tratamiento subcrónico de NAC.
5. Identificar el efecto del tratamiento subcrónico de NAC en el perfil redox del tejido cerebral evaluando los niveles de GSH/GSSG, ERO y lipoperoxidación.
6. Definir una asociación entre la modulación de los niveles cerebrales de KYNA mediada por NAC y parámetros cognitivos de memoria y aprendizaje.

5. MÉTODOS

5.1 Estandarización de cultivos primarios de astrocitos

Se obtuvieron astrocitos de cerebro completo de ratas neonatas P3. Se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro y se mantuvo en solución Hanks para retirar las meninges. El tejido fue disociado mecánicamente con un bisturí y posteriormente con ayuda de una pipeta Pasteur (con apertura de 1 mm) se homogenizó cuidadosamente (3X). Se centrifugó a 1200 g y se decantó el sobrenadante. El tejido disociado se resuspendió en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y penicilina/streptomicina 1%. Posteriormente, las células fueron mantenidas en frascos de 75 cm² a 37 °C a 5% de CO₂ y a continuación fueron incubadas a 37 °C con concentraciones crecientes de GSH y NAC (0.5, 1 y 2 mM) durante 2h.

5.2 Preparación de homogenados de cerebro

Para los experimentos *in vitro* con tejido cerebral, se utilizó como sistema biológico a los homogenados de tejido de rata. Ratas Sprague-Dowley adultas de entre 250-

300 g fueron sacrificadas utilizando una cámara de CO₂, rápidamente fueron decapitadas y el cerebro fue extraído para su homogenización 1:10 en buffer Krebs-Ringer (NaCl 118.5 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.77 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucosa 5 mM, NaH₂PO₄ 12.9 mM y NaHPO₄ 3 mM; pH 7.4). Una vez homogenizados se probaron concentraciones crecientes de NAC y GSH (0.03, 0.3, 0.5, 1, 2, 3 y 30 mM) en incubaciones de 2h a 37 °C.

5.3 Rebanadas corticales de cerebro

Ratas Sprague-Dawley adultas de entre 250-300 g fueron sacrificadas utilizando una cámara de CO₂, rápidamente fueron decapitadas, el cerebro se extrajo del cráneo y la disección se realizó utilizando una plataforma plástica sobre hielo. Cada

corteza cerebral fue colocada en discos plásticos, las rebanadas corticales (1 mm x 1 mm) fueron obtenidas utilizando una cuchilla automatizada McIlwain (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, U.K.). Las rebanadas fueron rápidamente sumergidas en un amortiguador Krebs pre-oxigenado por 30 min (118.5 mM, NaCl; 4.75 mM, KCl; 1.77 mM, CaCl₂; 1.18 mM, MgSO₄; 5 mM, glucose; 12.9 mM, NaH₂PO₄ and 3 mM, Na₂HPO₄; pH 7.4) y mantenidas en hielo.

5.3.1 Incubación de rebanadas corticales

Se colocaron dos rebanadas corticales por pozo en una caja para cultivo celular de 48 pozos. El volumen final de incubación fue de 100 µl, los compuestos a probar se ajustaron a un volumen de 10 µl (10 veces más concentrados), incluido el precursor de la síntesis de KYNA: kinurenina (2 o 10 µM). Antes de agregar la kinurenina se realizó una pre-incubación de 10 min a 37°C, en un baño de agua, con los compuestos a probar. Se utilizó AOAA, un inhibidor general de aminotransferasas, como blanco para diferenciar entre la producción *de novo* de KYNA a partir del precursor y los niveles endógenos del tejido. Las rebanadas fueron incubadas durante 2h a 37°C. Para detener la producción enzimática de KYNA el sobrenadante de cada pozo fue transferido a tubos eppendorf de 0.5 ml que contenían 10 µl de una mezcla de 25% de ácido perclórico (PCA) y HCl 1N. Las muestras se centrifugaron a 18,300x *g*. y almacenadas a -70 para la posterior determinación de los niveles de KYNA. Las rebanadas fueron transferidas a tubos eppendorf con 100 µl de agua ultrapura y conservadas a -80 °C para la posterior cuantificación de proteína.

5.4 Implantación de cánulas

Para el procedimiento quirúrgico, se usaron ratas macho Sprague-Dawley (250-320 g), las cuales fueron anestesiadas por inhalación usando isoflurano (3-5% en oxígeno). Se realizaron cuatro perforaciones a nivel de cráneo, en tres de las cuales se colocaron tornillos de soporte y en la cuarta perforación se implantó la cánulaguía (BASi) siguiendo las siguientes coordenadas para Corteza Media Prefrontal(mPFC): AP, 3.2 mm posterior a bregma; L, ± 0.8 mm a partir de la línea media; V: 2.0 mm a nivel de cráneo. La cánula guía, así como los tornillos (para sostener el implante), fueron fijados con acrílico dental.

5.5 Microdiálisis

Al día siguiente de la implantación de la cánula guía, una cánula de microdiálisis (longitud de membrana: 2 mm; SciPro, Sanborn, New York, USA) fue insertada a través de la cánula guía. Posteriormente, la cánula de microdiálisis fue conectada a una bomba de microperfusión programada a una velocidad de 1.1 μ L/min. Durante todo el experimento de microdiálisis las ratas se mantuvieron en libre movimiento sin la aplicación de ningún tipo de anestesia. Para obtener los microdializados se utilizó solución Ringer (144 mM, NaCl; 4.8 mM, KCl; 1.7 mM, CaCl₂; 1.2 mM, MgSO₄; pH 6.7). En cada experimento los dializados fueron recolectados cada 30 min, aquellos obtenidos durante las primeras 2 h se utilizaron para establecer una línea base como niveles de referencia para comparar los efectos de los distintos tratamientos con la concentración basal de KYNA. Para probar el efecto de NAC sobre los niveles de KYNA cerebrales; después del establecimiento de

la línea base, se realizaron dos inyecciones intraperitoneales (i.p) de NAC (125 o 500 mg/kg, pH 6.8) o del vehículo (solución salina 0.9 %) 2 h y 1 h antes de la administración i.p de kinurenina (50 mg/kg; pH 7.0), concentración previamente reportada para inducir la síntesis *de novo* de KYNA e incrementar sus niveles basales (Konradsson-Geuken *et al.*, 2010). Posterior a la administración de kinurenina, las muestras fueron recolectadas cada 30 min por 6 h. Después de la recolección de cada muestra, estas fueron diluidas 1:2 con agua ultrapura. Se utilizó cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) con detección por fluorescencia para determinar la concentración de KYNA en cada muestra.

5.6 Determinación de niveles de KYNA por HPLC

Se inyectaron 20 µl de muestra en el cromatógrafo de líquidos de alta afinidad acoplado a un detector de fluorescencia (S-200, Perking Elmer) para la cuantificación de KYNA. Usando una fase móvil constituida de la siguiente manera: 250 mM acetato de zinc, 50 mM acetato de sodio y 3% de acetonitrilo (pH 6.2) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. KYNA fue detectada fluorométricamente (excitación: 344 nm; emisión: 398 nm). El tiempo de retención de KYNA fue de aproximadamente 7 min. De acuerdo con el método de detección transcurridos los 12 min, se obtiene el área y la altura del pico de KYNA para cada caso. En cada corrida se colocó una curva de KYNA que iba a partir de los 10 fmoles hasta los 200 fmoles, para asegurarnos de la selectividad de nuestro compuesto y así mismo estandarizar las concentraciones obtenidas.

5.7 Actividad enzimática de KATII

Para la determinación de la actividad enzimática de KATII cada hemisferio del cerebro fue pesada, congelada inmediatamente en hielo seco y homogenizada por sonicación en agua ultrapura (cerebro: 1:5, p/v; hígado 1:10, p/v). Los homogenados fueron diluidos nuevamente (1:2 para cerebro, v/v; 1:30 para hígado, v/v) en un amortiguador que contenía 5 mM Tris-acetato (pH 8.0) adicionado con el cofactor enzimático piridoxal-5'-fosfato (50 μ M) y 2-mercaptoetanol (10 mM). 80 μ l del homogenado fueron posteriormente incubados durante 2 h a 37°C en presencia de kinurenina (100 μ M) en un amortiguador que contenía Tris-acetato (150 mM, pH 7.4), piruvato (1 mM) y piridoxal-5'-fosfato (80 μ M), sumando un volumen final de incubación de 200 μ l. Los efectos de NAC o GSH fueron examinados añadiendo 20 μ l de los compuestos (concentraciones finales: 30 μ M, 300 μ M, 3 mM) a la mezcla de incubación. Los blancos de la actividad enzimática de KATII fueron obtenidos al añadir 20 μ l del inhibidor enzimático AOAA (concentración final: 1 mM) al medio de incubación. La reacción enzimática fue detenida añadiendo 20 μ l de ácido tricloroacético al 50% (w/v) y 1 ml de HCl 0.1 M. Después de las diluciones finales necesarias, 20 μ l de la muestra fueron inyectadas a una columna C18 de fase reversa (BDS-Hypersil 100 mm x 4.6 mm; Thermo Scientific, USA), a través de la cual KYNA eluyó isocráticamente a una velocidad de flujo de 1 ml/min usando una fase móvil cuya composición química consistía en 250 mM de acetato de zinc, 50 mM de acetato de sodio y 3% de acetonitrilo (pH 6.2). En el eluido, KYNA fue detectada fluorométricamente (λ de excitación: 344 nm, λ de emisión: 398 nm; utilizando un detector de fluorescencia S200; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

El tiempo de retención para KYNA fue de ~7 min (Shibata, 1988).

5.8 Determinación de la actividad de KMO y 3HK

El tejido cerebral fue pesado y después homogenizado (1:10 p/v) en buffer Krebs (pH 7.4). El homogenado fue diluído (1:2 v/v) en un buffer con 100 mM de Tris-HCl (pH 8.1) adicionado con KCl 10 mM y EDTA 1 mM. 100 μ L de esta dilución fueron incubados por 2h a 37°C en una solución de NADPH 1 mM, glucosa-6-fosfato 3 mM, 1 u/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 100 μ M Kyn, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.1), 10 mM KCl, y 1 mM EDTA en un volumen total de 200 μ L. La reacción se detuvo con la adición de 50 μ L de 6% de ácido perclórico. Los blancos se obtuvieron hirviendo las muestras durante 10 min. Después de la centrifugación (14,600 \times g, 10 min), 100 μ L del sobrenadante fueron inyectados y analizados a través de una columna 3 μ m Adsorbosphere C₁₈ fase reversa (4.6 \times 100 mm; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando una fase móvil de 1.5% acetonitrilo, 0.9% trietilamina, 0.59% ácido fosfórico, 0.27 mM EDTA, y 8.9 mM de heptano sulfonato de sodio a un flujo de 0.6 mL/min. En el eluído, el producto de la reacción, 3-HK, fue detectado electroquímicamente usando un detector LC-4C (BAS, West Lafayette, IN, USA), potencial de oxidación: +0.5 V. El tiempo de retención para 3-HK fue de ~11 min. Para la determinación de los niveles endógenos de 3-HK, el tejido cerebral fue homogenizado en agua ultrapura (1:10 p/v). 25 μ L de 6% de ácido perclórico fue adicionado a 200 μ L de la muestra. Después de mezclar muy bien las muestras las proteínas fueron precipitadas y removidas por centrifugación (14,600 \times g, 10 min). 100 μ L del sobrenadante resultante fueron sujetos a análisis por HPLC, y los niveles de 3-HK fueron detectados del mismo modo como se describe arriba.

5.9 Determinación de proteínas

La proteína fue determinada de acuerdo con el método de Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951) usando una curva de albúmina como estándar.

5.10 Cuantificación de GSH/ GSSG

La cuantificación de glutatión, tanto en su forma reducida (GSH) como oxidada (GSSG) se determinó por fluorescencia utilizando derivatización por o-ftalaldehído adaptado a microplaca siguiendo el método de cuantificación reportado previamente por Senft *et al.* (Senft *et al.*, 2000). El tejido se homogenizó utilizando una dilución 1:10 (peso/volumen) en una solución amortiguadora (Buffer A) que contiene cloruro de potasio (KCl) 154 mM, ácido dietilenotriaminopenta acético (DTPA) 5 mM y fosfato de potasio 0.1 M (KPi), pH 6.8. Al homogenado se le agregó la solución amortiguadora (Buffer B): 40 mM ácido clorhídrico (HCl), 10 mM DTPA, 20 mM ácido ascórbico y 10% ácido tricloroacético (TCA), se mezcla por inversión. Enseguida, esta mezcla se centrifugó a 14, 000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de 0.45 µm y se trasladó a un tubo eppendorf nuevo. Una vez filtrada, la muestra es estable para determinar los niveles de GSH o GSSG, durante 4 semanas manteniéndose a una temperatura de -70 °C.

Curva estándar de GSH

La solución de glutatión para la curva estándar se preparó en amortiguador de enfriamiento redox ("Redox quenching buffer", RQB): 20 mM HCl, 5 mM DTPA, 10mM ácido ascórbico al cual se le añade TCA al 5% (TCA-RQB). Para evitar la oxidación de GSH, por cada ml de GSH (1 mM) se agregan 25 mg de Zinc y se filtra ($\theta \leq 0.22 \mu\text{m}$).

Se realizaron dos reacciones, una independiente de GSH (NEM) tubo A y otra dependiente de GSH (tubo B).

Los reactivos se agregaron en el orden en el que se muestran en la siguiente tabla:

Reactivos	Reacción A (independiente de GSH)						Reacción B (dependiente de GSH)					
GSH 0-2nmol (µL)	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
5% TCA-RQB (µL)	30	29	28	27	26	25	30	29	28	27	26	25
NEM (µL)	A todos se les agregan 4 µL						A todos se les agregan 4 µL de RQB					
Buffer de PK 1M pH: 7	A todos se les agregan 50 µL											
<i>Se agitan un poco y se incuban por 5 minutos a temperatura ambiente y sin oscuridad</i>												
Buffer de PK 0.1M pH: 6.9	A todos se les agregan 200 µL											
OPA 5mg/mL	A todos se les agregan 30 µL											
<i>Se incuban la placa en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente y se lee a 365/5-nm excitación y 430/20-nm de emisión</i>												

Curva estándar GSSG

Se preparó una solución estándar con GSSG (1 mM) utilizando el mismo amortiguador TCA-RQB. Se utilizaron los mismos reactivos para la curva estándar de GSH más 100 mM hidrosulfito de sodio (DT). La reacción se realizó siguiendo el orden indicado en la siguiente tabla:

Reactivos	Reacción A (independiente de GSH)						Reacción B (dependiente de GSH)					
GSSG 0-2nmol (µL)	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
5% TCA-RQB (µL)	30	29	28	27	26	25	30	29	28	27	26	25
NEM (µL)	A todos se les agregan 4 µL											
Buffer de PK 1M pH: 7	A todos se les agregan 50 µL											
<i>Se agitan un poco y se incuban por 5 minutos a temperatura ambiente y sin oscuridad</i>												
DT (un solo uso, en oscuridad)	A todos se les agregan 6 µL de RQB						A todos se les agregan 6 µL de DT					
<i>Se incuban la placa por 60 minutos a temperatura ambiente, no es necesario que sea en oscuridad</i>												
Buffer de PK 0.1M pH: 6.9	A todos se les agregan 200 µL											
OPA 5mg/mL	A todos se les agregan 30 µL											
<i>Se incuban la placa en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente y se lee a 365/5-nm excitación y 430/20-nm de emisión</i>												

Para la cuantificación de GSH o GSSG en las muestras del tejido, se siguió el mismo procedimiento correspondiente a la curva estándar preparando la misma reacción sustituyendo los estándares de GSH o GSSG por hasta 30 µl del homogenado.

5.11 Tratamiento Subcrónico con NAC

Ratones FVB de diez semanas de edad se les administró diariamente NAC (100mg/kg, i.p.) o solución salina a las 8:00 am, durante 7 días (20 animales por grupo, en un total de 40 ratones). Los cerebros de cada grupo de ratones

(10 de Salina y 10 de NAC) fueron divididos en dos mitades; una mitad fue usada para la preparación de rebanadas de tejido (ensayos *ex vivo*) y la otra mitad fue utilizada para los análisis bioquímicos (actividad de KATII y KMO, niveles de KYNA y 3HK, GSH, GSSG, peroxidación de lípidos y producción de ERO).

Los 20 ratones restantes (10 salina y 10 de NAC) fueron usados para las evaluaciones de memoria y aprendizaje.

5.12 Disección y recolección de tejido cerebral

Los ratones fueron sacrificados por decapitación 6 h después de su última inyección i.p en el día 7. Los cerebros fueron rápidamente removidos, y la corteza disectada en hielo. Para los experimentos con rebanadas de tejido, bloques de 1 x 1 mm fueron preparados usando una navaja delgada, sumergiéndolos inmediatamente después en el amortiguador KREBS- Ringer (118.5 mM NaCl; 4.75 mM KCl; 1.77 mM CaCl₂; 1.18 mM MgSO₄; 5 mM glucosa; 12.9 mM NaH₂PO₄; and 3 mM Na₂HPO₄; pH 7.4). Todos los demás tejidos fueron rápidamente congelados y mantenidos a -80 °C para su análisis posterior.

5.13 Evaluación de la memoria y aprendizaje por el paradigma de la ubicación del alimento enterrado

Un investigador cegado a los grupos experimentales del protocolo realizó el análisis de los experimentos de conducta. La evaluación BFT es una adaptación del modelo descrito por Lehkmul *et al.*, (2014). para la evaluación de la disfunción olfativa. Tomando como antecedente que la administración aguda de Kyn induce déficits cognitivos, se formaron 4 distintos grupos experimentales: 1) Salina, 2) NAC, 3) Salina + Kyn y 4) NAC + Kyn. Los grupos 3 y 4 recibieron una sola inyección i.p de Kyn (100 mg/kg) 60 min antes de la sesión de entrenamiento (Adquisición) en el día 6 del tratamiento subcrónico con NAC o solución salina. Esta sesión consistió en 6 pruebas (con intervalos de 2 min) y una prueba "0" de inicio en el que el ratón fue colocado en una caja de acrílico (1 m²) cubierto con 2 cm de una capa de aserrín y en la presencia de un pellet azucarado "fruit loop" enterrado bajo 1 cm de aserrín siempre en una posición fija dentro del mismo cuadrante de la caja. La posición del pellet fue la misma durante todo el entrenamiento, la caja tenía pistas espaciales (figuras geométricas negras de 10 cm x 10 cm, ubicados a la mitad de cada pared a 13 cm de altura). Para esta sesión los animales fueron puestos en ayuno durante 24 h con libre acceso al agua. Si los ratones no eran capaces de encontrar el pellet dentro de los primeros 180 s de la primera prueba, éstos fueron guiados hacia su posición (el fruit loop se colocó superficialmente). A cada ratón se le permitió comer el fruit loop durante 5 s. Después de cada prueba, los animales fueron regresados a su caja de alojamiento y la caja acrílica de prueba fue limpiada con 10% de etanol para eliminar cualquier rastro odorífero.

La memoria fue evaluada 24 h posteriores a la sesión de entrenamiento. El tiempo que cada ratón (con un máximo de 3 min) tardó en recordar la posición en la que se encontraba el pellet fue videograbado para su análisis posterior. Todas las grabaciones fueron analizadas con el software de rastreo Debut Video Capture and Screen Recorder. Los resultados se expresan como el tiempo que tarda cada ratón en localizar la posición blanco así como el tiempo invertido en la búsqueda del pellet.

5.14 Actividad locomotora

La actividad locomotora fue evaluada en todos los animales inmediatamente después de la evaluación de memoria, usando el sistema OptoVarimex 4 (Columbia, OH, USA). Brevemente, la actividad motora fue grabada durante 5 min después del periodo de habituación; el tiempo y el patrón de exploración fueron registrados por el software acoplado al sistema OptoVarimex 4 system y los resultados se expresan como la distancia total recorrida (cm).

5.15 Determinación de Peroxidación de Lípidos (PL) y ERO

El tejido cerebral de 10 animales por grupo (Salina y NAC) fue pesado y homogenizado (1:10, p/v) en el amortiguador Krebs-Ringer (pH 7.4). Ambos ensayos fueron llevados a cabo simultáneamente en el tejido homogenizado e incubados solo en Krebs-Ringer o en presencia de FeSO_4 (5 μM) por 2 h a 37 °C en un baño de agua. La PL fue evaluada por la reacción de especies reactivas a TBA (TBA-RS) y la formación de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las células. Seguido de la incubación, las muestras fueron hervidas con 250 μl

de TBA (0.375 g TBA y 15 g ácido tricloroacético (TCA) + 2.54 mL HCl en 100 mL de agua) en baño maría por 15 min. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en hielo y centrifugadas (12, 000x *g*, 10 min). La concentración de MDA fue determinada como producto colorimétrico por espectrofotometría usando un lector de placas Synergy™ HTX (Biotek Instruments) a una longitud de onda de 532 nm. Los resultados se expresan en micromoles de MDA por mg de proteína.

Las ERO fueron evaluadas a través de la oxidación de DCF-DA. Después de la adición de DCF-DA (75 µM, concentración final), los homogenados de cerebro fueron incubados durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (9000x *g*, 10 min), y la formación de ERO fue cuantificada en el sobrenadante usando espectrometría de fluorescencia (lector de placas Synergy™ HTX, Biotek Instruments) a una longitud de excitación de 448nm y una longitud de emisión de 532 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de ERO respecto a los controles.

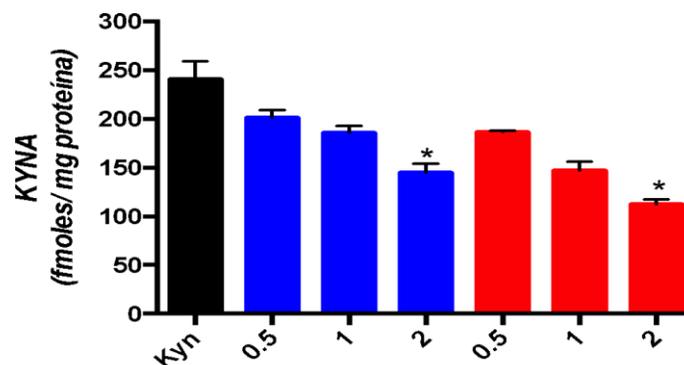
6. RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE GSH Y NAC SOBRE LA PRODUCCIÓN DE KYNA EN ASTROCITOS PRIMARIOS.

Se ha documentado ampliamente que la producción de KYNA se da casi exclusivamente al interior de las células astrocíticas, ya que es en estas células en donde se localiza la KATII, la principal enzima encargada del catabolismo del precursor L-kinurenina a KYNA a través de la transaminación oxidativa.

Para determinar si cambios en los niveles de GSH podían afectar la producción *de novo* de KYNA; los cultivos de astrocitos primarios fueron tratados

directamente con GSH o NAC. Se ha comprobado previamente que este precursor puede atravesar membranas celulares y así establecer su efecto en la producción endógena de GSH en los astrocitos primarios (Aoyama *et al.*, 2006; Parsons & Chipman, 2000). Tal y como se muestra en la gráfica 1, la síntesis *de novo* de KYNA es estimulada a partir de la incubación con 100 μ M del precursor kinurenina, sin embargo, esta producción *de novo* se reduce de manera concentración- dependiente después de los tratamientos con GSH y NAC. En el caso de GSH la producción *de novo* de KYNA disminuye en 11%, 29% y 41% correspondientes a las distintas concentraciones probadas: 0.5, 1 y 2 mM, respectivamente. El efecto de NAC sobre la producción de KYNA en astrocitos se observó de manera más marcada en comparación con GSH, a partir de la concentración más baja (0.5 mM) la reducción en KYNA fue del 24%, mientras que se alcanzó un 32% y 56 % para las concentraciones más altas (1 y 2 mM).

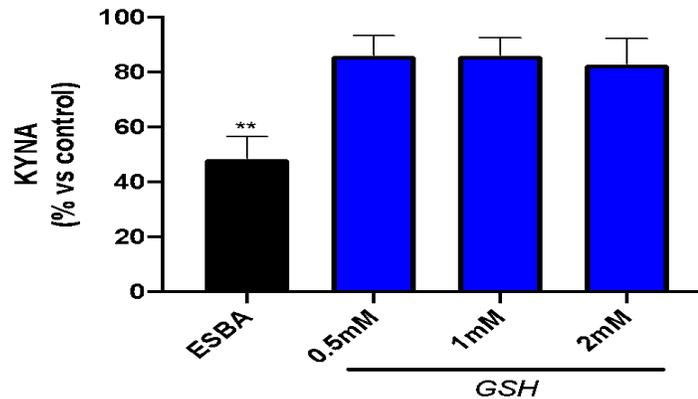


Gráfica 1. Efecto de GSH y NAC sobre la producción de novo de KYNA en cultivo primarios de astrocitos. Se muestra el efecto del tratamiento con GSH y NAC a tres distintas concentraciones (0.5, 1 y 2 mM, 2h de incubación) sobre la producción de KYNA estimulada a través de la adición del precursor kinurenina (100 μ M) al medio de incubación de 100,000 células por tratamiento. Se muestra una reducción diferenciada de manera concentración-dependiente. Los datos se muestran como el promedio \pm el error estándar de tres experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs Kyn mediante la prueba post-hoc de Dunn's $p < 0.05$.

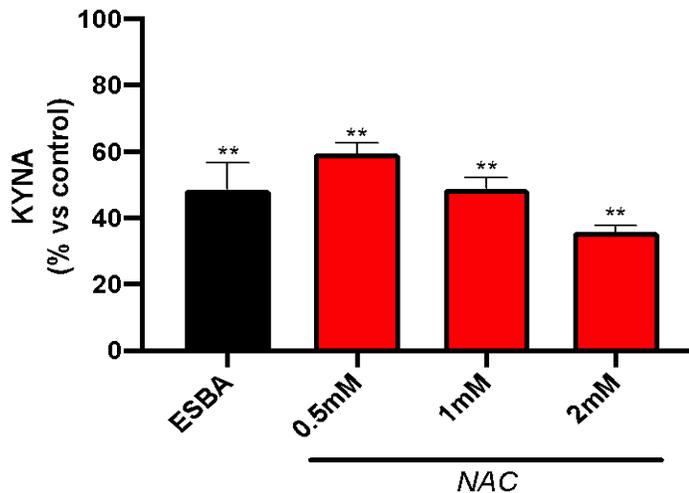
6.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE GSH Y NAC EN LA PRODUCCIÓN DE NOVO DE KYNA ENHOMOGENADOS DE CEREBRO E HÍGADO DE RATA

Utilizando las mismas concentraciones de NAC y GSH para los tratamientos en astrocitos primarios, el siguiente paso fue determinar si el mismo efecto podía observarse utilizando homogenados de cerebro de rata.

Del mismo modo que con los tratamientos con astrocitos, la producción *de novo* de KYNA fue estimulada con la adición de kinurenina 100 μM a la incubación bajo condiciones fisiológicas usando amortiguador Krebs. Se utilizó como control positivo de referencia el tratamiento con un inhibidor específico de KAT II, el 4- etilsulfonilbenzoalanina hidrocloreuro (ESBA) a una concentración final de 9 μM considerando que presenta una IC_{50} = 6.1 μM . Tal y como se esperaba, se determinó que el tratamiento con el inhibidor específico de KAT II, ESBA (9 μM) redujo la síntesis de KYNA en un $\approx 50\%$. La producción *de novo* de KYNA no resultó modificada significativamente tras el tratamiento directo con las distintas concentraciones de GSH, tal y como se muestra en la gráfica 2, cuando los niveles de KYNA fueron comparados con respecto al control (100%) incubado sólo con kinurenina (100 μM). A diferencia de GSH, el tratamiento con NAC (gráfica 3) usando las mismas concentraciones probadas para GSH, disminuye la producción *de novo* de KYNA de manera significativa en un modo concentración-dependiente: $59.6 \pm 1.7\%$ (0.5 mM) , $48.7 \pm 1.98\%$ (1mM) y $35.73 \pm 1.15 \%$ (2 mM) respecto al control (kinurenina 100 μM).

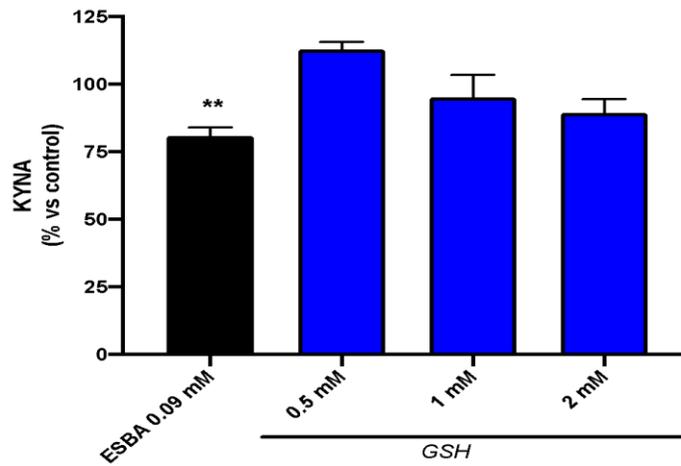


Gráfica 2. Efecto de GSH en la producción *de novo* de KYNA en homogenados de cerebro de rata. Se determinó el efecto de distintas concentraciones de GSH en la producción *de novo* de KYNA estimulada por el tratamiento con 100 μ M de Kinurenina. En cada experimento independiente, cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado y con una incubación de 2 h; los datos se presentan como porcentajes respecto al control kinurenina (330.4 ± 14.6 fmoles/ μ l/mg de tejido; n= 3). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs control kyn mediante la prueba post-hoc de Dunn's **p< 0.005.

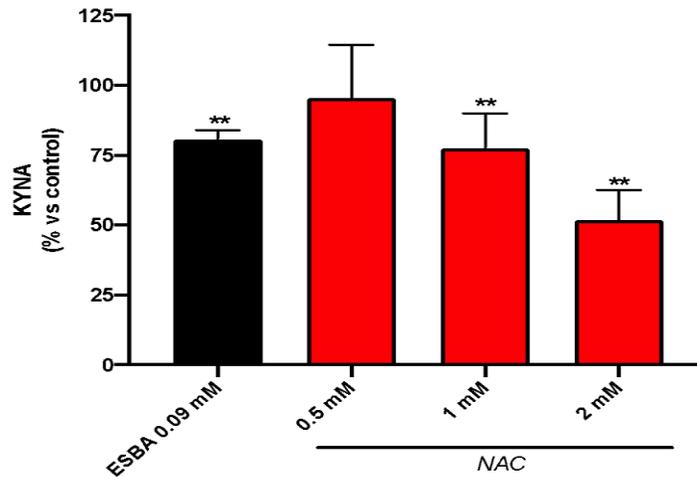


Gráfica 3. Efecto de NAC en la producción *de novo* de KYNA en homogenados de cerebro de rata. Se determinó el efecto de distintas concentraciones de NAC en la producción *de novo* de KYNA estimulada por el tratamiento con 100 μ M de kinurenina. En cada experimento independiente, cada tratamiento se realizó por triplicado con 2 h de incubación; los datos se presentan como porcentajes respecto al control kinurenina (330.4 ± 14.6 fmoles / μ l /mg de tejido; n= 3). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs control kyn mediante la prueba post-hoc de Dunn's **p< 0.005.

De manera paralela, también se determinó el efecto de GSH y NAC usando la misma curva de concentración anterior en homogenados de hígado de rata. Se ha descrito que particularmente es el hígado el tejido que concentra la mayor cantidad proteica de KATII. Por lo que la síntesis enzimática de KYNA en hígado es casi exclusivamente llevada a cabo por KAT II; sin embargo, a diferencia del cerebro la inhibición de ESBA (9 μ M) redujo la síntesis de KYNA en un \approx 25% esto podría atribuirse a la cantidad de proteína (KATII) presente en el hígado, siendo la concentración de ESBA insuficiente en este ensayo para reducirla a los niveles observados en cerebro. Del mismo modo que en cerebro, el tratamiento con distintas concentraciones de GSH no afectó de manera significativa la cantidad de KYNA producida a partir de kinurenina (100 μ M) en homogenados de hígado (gráfica 4). Los tratamientos con NAC en homogenados de hígado lograron reducir de manera significativa la producción *de novo* de KYNA, sin embargo, a diferencia de lo observado en cerebro, la concentración más baja (0.5 mM) no resultó distinta al control. Las concentraciones de 1 y 2 mM redujeron significativamente la producción de KYNA en un \sim 20% y \sim 40%, respectivamente (gráfica 5).



Gráfica 4. Efecto de GSH en la producción *de novo* de KYNA en homogenados de hígado de rata. Se determinó el efecto de distintas concentraciones de GSH en la producción *de novo* de KYNA estimulada por el tratamiento con 100 μ M de kinurenina. En cada experimento independiente, cada tratamiento se realizó por triplicado; los datos se presentan como porcentajes respecto al control kinurenina ($28,425 \pm 2052$ fmoles/ μ l/mg de tejido; n= 3). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs control kyn mediante la prueba post-hoc de Dunn's $**p < 0.005$.



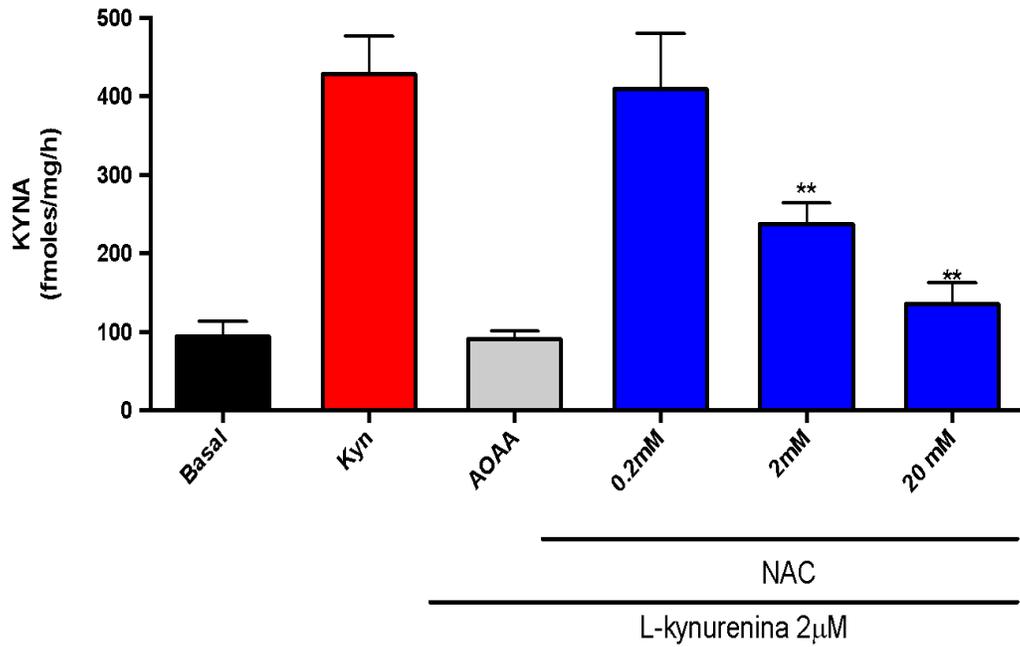
Gráfica 5. Efecto de NAC en la producción *de novo* de KYNA en homogenados de hígado de rata.

Como se describe en el texto, se determinó el efecto de distintas concentraciones de NAC en la producción *de novo* de KYNA estimulada por el tratamiento con 100 μ M de kinurenina. En cada experimento independiente, cada tratamiento se realizó por triplicado; los datos (promedio \pm SEM) se presentan como porcentajes respecto al control kynurenine ($28,425 \pm 2052$ fmoles/ μ l/ mg de tejido; $n=3$). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs control kyn mediante la prueba post-hoc de Dunn's $**p < 0.005$.

6.3 EFECTO DE NAC EN LA PRODUCCIÓN *DE NOVO* DE KYNA EN REBANADAS CORTICALES DE CEREBRO DE RATA.

Las rebanadas corticales de cerebro son un modelo experimental que ha mostrado integrar varios procesos necesarios para síntesis y liberación de KYNA desde la célula: el transporte de kinurenina hacia el interior de la célula, seguida de su transaminación intracelular de manera irreversible catalizada principalmente por KATII permitiendo que KYNA se acumule dentro de la célula y pueda ser liberada posteriormente hacia el medio extracelular (Turski *et al.*, 1989). El modelo se ajustó a dos rebanadas corticales con un volumen final de incubación de 100 μ l; a diferencia de los homogenados, se utilizó una concentración de kinurenina cercana a la concentración fisiológica reportada para el cerebro de roedores, 2 μ M (Turski *et al.*, 1989). Debido a que el tratamiento con GSH no afectó de manera directa la producción *de novo* de KYNA, los experimentos en

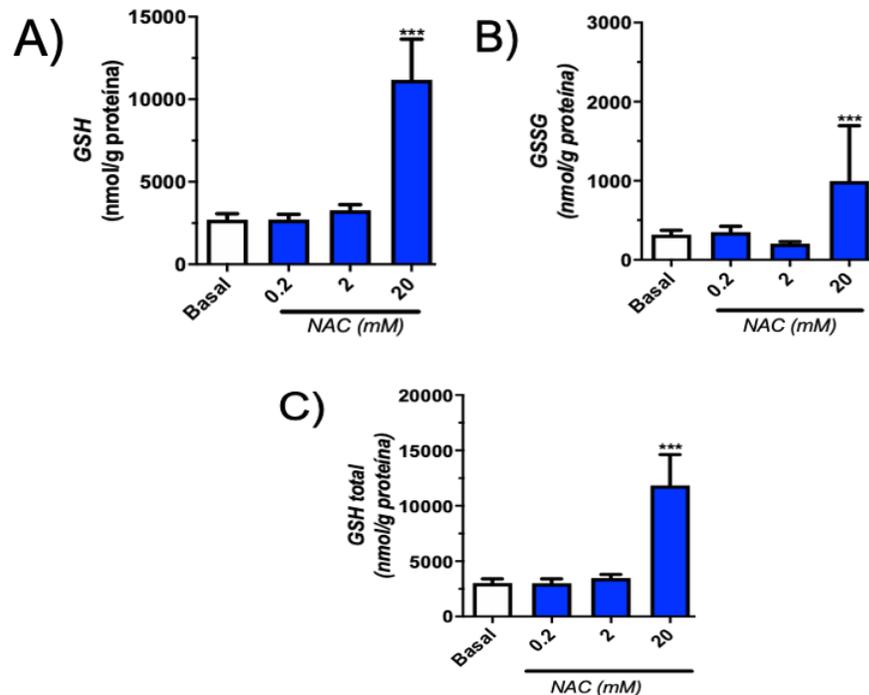
rebanadas corticales se realizaron sólo con concentraciones crecientes de NAC (0.2, 2, 10 y 20 mM); se utilizó AOAA (inhibidor general de aminotransferasas) como blanco para poder diferenciar la producción enzimática de KYNA de los niveles endógenos presentes en el tejido cerebral de manera basal, tal como se muestra en la gráfica 6. Comparado con el control, es decir, aquellas rebanadas incubadas sólo con 2 μ M de kinurenina en buffer Krebs (KYNA: 411.8 ± 30.7 fmoles/ h/ mg de proteína), las concentraciones de NAC 2 y 20 mM disminuyeron significativamente la producción y liberación de KYNA al medio extracelular, los datos representados en fmoles/ h/mg de proteína fueron los siguientes: 0.2 mM = 386.5 ± 73.08 , 2 mM = 254.0 ± 27.0 and 20 mM = 53.28 ± 18.94 (gráfica 6). Es decir, el tratamiento con NAC en rebanadas corticales reduce en un ~ 40% al usar 2 mM y ~ 80% con 20 mM.



Gráfica 6. Efecto de NAC en la producción de KYNA en rebanadas corticales de cerebro de rata. La producción y liberación de KYNA por rebanadas corticales expuestas a 2 μ M de kinurenicina incubadas a 37 °C durante 2 h. Los datos son representados como promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs Kyn mediante la prueba post-hoc de Dunn's ** $p < 0.005$.

6.3.1 NAC INDUCE LA SÍNTESIS DE GSH EN REBANADAS CORTICALES SÓLO A ALTAS CONCENTRACIONES

Para determinar si el efecto en los niveles de KYNA por el tratamiento agudo con NAC dependía necesariamente de la síntesis de GSH, se determinaron los niveles de glutatión total, reducido GSH y oxidado GSSG. Cabe mencionar que a pesar de que el efecto de NAC sobre los niveles de KYNA durante la síntesis *de novo*, tanto en rebanadas como en homogenados, se observó a partir de la concentración de 2 mM, la cuantificación de los niveles totales de GSH revela que NAC incrementa los niveles endógenos ~ 4 veces ($11,178 \pm 2471$ nmol/ g de proteína) con respecto a los niveles basales (2707 ± 360.1 nmol/ g de proteína) cuando las rebanadas corticales son incubadas con una concentración de 20 mM (gráfica 7). Asimismo, los niveles de GSSG bajo esta misma concentración de NAC aumentaron de 318.5 ± 55.42 nmol/ g de proteína a 2027 ± 679 nmol/ g de proteína. La ausencia de cambios en los niveles de GSH tras el tratamiento con NAC 0.5 y 2 mM indica que la disminución de los niveles de KYNA producidos *de novo* en rebanadas corticales de cerebro de rata no depende de la inducción de la síntesis de GSH o de alguna modificación en sus niveles endógenos; por lo que, otros mecanismos independientes a la síntesis de GSH deben de estar involucrados en la reducción de la síntesis de KYNA en cerebro.

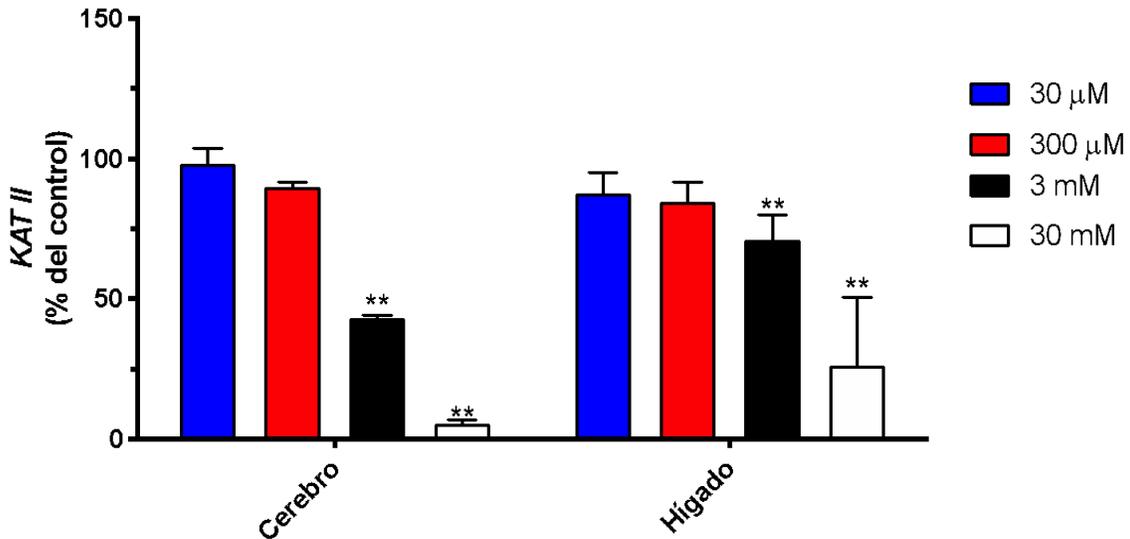


Gráfica 7. Niveles de GSH y GSSG en rebanadas corticales de cerebro de rata incubadas con NAC. Niveles de A) GSH, B) GSSG y C) GSH total producidos y liberados por rebanadas corticales al medio extracelular tras ser incubados con concentraciones crecientes de NAC (0.2, 2 y 20 mM) a 37 °C durante 2 h. Los datos se muestran como el promedio ± SEM de tres experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs basal mediante la prueba post-hoc de Dunn's ***p < 0.001.

6.3 NAC INHIBE LA ACTIVIDAD DE KATII IN VITRO EN HOMOGENADOS DE CEREBRO E HÍGADO DE RATA

Después de determinar que las concentraciones de NAC menores a 20 mM no modificaban los niveles endógenos de GSH, es decir, no promovían la síntesis de GSH en el tejido cerebral de rata pero sí reducían significativamente la síntesis de KYNA, evaluamos si NAC era capaz de modificar la actividad de KAT II *in vitro*. Esta vez se realizó una curva distinta considerando concentraciones de NAC inferiores a 2 mM. La actividad de KAT II en homogenados de cerebro de rata fue inhibida de manera eficiente por NAC de modo concentración-dependiente; expresada como porcentajes con respecto al control

(443.3 ± 70.8 pmoles/h/mg de proteína): $30 \mu\text{M} = 98.4 \pm 2.4\%$, $300 \mu\text{M} = 90 \pm 0.7\%$, $3 \text{ mM} = 43.1 \pm 0.5 \%$ (gráfica 8). La misma tendencia de inhibición concentración-dependiente por NAC también se observó en la actividad de KATII de homogenados de hígado con los siguientes porcentajes respecto al control: 87.8 ± 3 , 84.5 ± 2.9 , 71 ± 3.7 y $26.2 \pm 9.9 \%$, para $30 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, 3 y 30 mM , respectivamente (gráfica 8). Estos resultados indican que el efecto de NAC en la síntesis de KYNA involucra la inhibición de la actividad enzimática de la KATII.

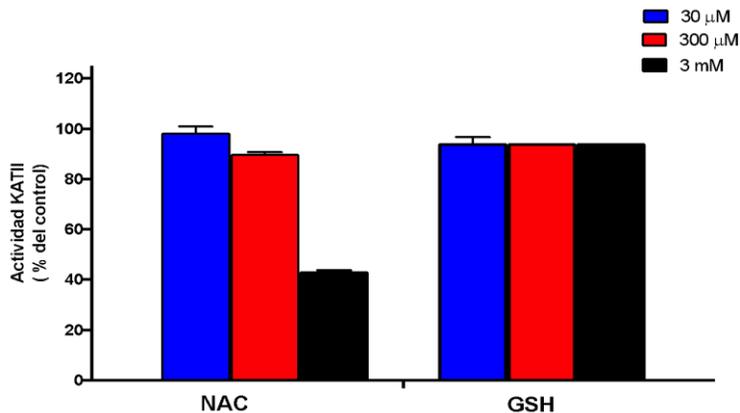


Gráfica 8. Efecto de NAC en la actividad de KATII en homogenados de cerebro e hígado de rata.

La actividad de KAT II en homogenados de cerebro e hígado fue evaluada después de ser incubados con concentraciones crecientes de NAC. La actividad control de KAT II fue de 443.3 ± 70.8 pmoles/h/mg de proteína. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de cinco experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs control mediante la prueba post-hoc de Dunn's $**p < 0.005$.

6.4 NAC, PERO NO GSH, INHIBE A LA KATII HUMANA (hKATII) DE MANERA CONCENTRACIÓN-DEPENDIENTE

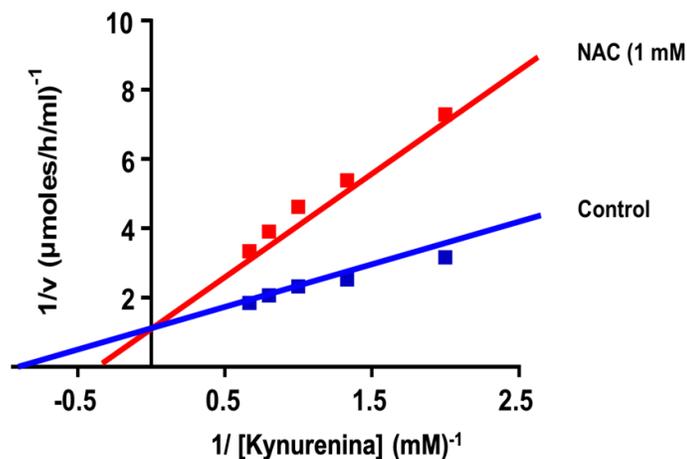
Para confirmar que el mecanismo involucrado en la reducción de la síntesis de KYNA se lleva a cabo a través de su efecto inhibitorio sobre la enzima KATII, se evaluó el efecto de GSH o NAC en la actividad de KAT II humana (hKATII) recombinante. Esta proteína fue incubada con concentraciones crecientes de GSH o NAC (concentraciones finales: 30 μ M, 300 μ M, 3 mM). La conversión del precursor kinurenina (10 μ M) a KYNA por la hKATII se determina por su actividad enzimática. Concentraciones crecientes de NAC indujeron una reducción significativa en la actividad de la hKATII (30 μ M = $88.6 \pm 3.63\%$, 300 μ M = $75.2 \pm 6.97\%$ y 3 mM $38.8 \pm 1.38\%$) (gráfica 9) cuando se comparó con el control (0.8 ± 0.2 μ moles KYNA/h/mg de proteína) mostrando una IC_{50} de ~ 500 μ M. En contraste, no se observó ningún efecto con el tratamiento de GSH usando las mismas concentraciones (gráfica 9).



Gráfica 9. Efecto de NAC en la actividad de la hKATII recombinante. La actividad de la hKAT II fue evaluada después de ser incubada con concentraciones crecientes de NAC y GSH. La actividad control de KAT II fue de 0.8 ± 0.2 μ moles/h/mg de proteína. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes comparados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples vs control mediante la prueba post-hoc de Dunn's (** $p < 0.005$).

6.4.1 EFECTO DE NAC SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA hKATII RECOMBINANTE CON CONCENTRACIONES VARIABLES DEL SUSTRATO KINURENINA

En un experimento realizado por separado, diseñado para caracterizar el comportamiento inhibitorio de NAC, se realizó una curva de inhibición enzimática de la KATII humana; debido a que se contaba con una cantidad limitada de enzima, la concentración de NAC se mantuvo fija en 1 mM esto de acuerdo con los experimentos anteriores en los cuales se determinó que la IC_{50} era de $\sim 500 \mu\text{M}$. Por otro lado, las concentraciones del sustrato kinurenina se evaluaron en un rango a partir de 0.5 mM hasta 1.5 mM. Esta curva reveló que NAC inhibe de manera competitiva a la hKATII con una constante de inhibición K_i de $450 \mu\text{M}$, calculada a través de la representación gráfica de Lineweaver-Burk tal y como se puede observar en la gráfica 10.

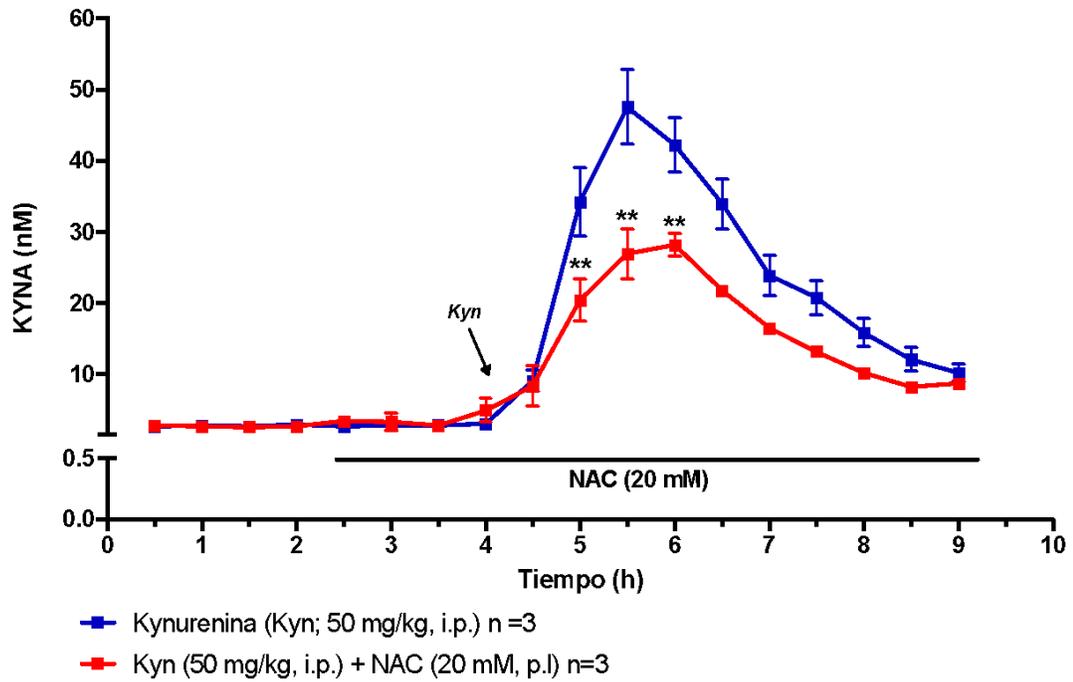


Gráfica 10. Representación de Lineweaver-Burk que muestra la curva de inhibición de NAC sobre la actividad de la hKATII recombinante con concentraciones variables del sustrato kinurenina. Representación doble-recíproca de la actividad de hKATII determinada en ausencia o presencia de NAC 1 mM. Los experimentos fueron realizados por duplicado variando la concentración de kinurenina de 0.5 a 1.5 mM.

6.5 EFECTO IN VIVO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBRAL DE NAC EN LA PRODUCCIÓN DE NOVO DE KYNA EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATA

Una vez confirmado que el efecto de NAC sobre la síntesis de KYNA en tejido cerebral y directamente en la hKATII recombinante involucra la inhibición competitiva de NAC sobre la actividad enzimática de KATII nos preguntamos si estos efectos observados en modelos *in vitro* podían afectar también la síntesis de KYNA en modelos *in vivo*. Debido a la evidencia experimental que demuestra que las fluctuaciones en los niveles de KYNA influyen tanto en parámetros cognitivos como en contextos patológicos, la búsqueda de inhibidores que sean capaces de modular los niveles intracerebrales de KYNA ha sido una constante; por esta razón, era indispensable determinar si la acción de NAC podía trasladarse a un contexto fisiológico en un modelo *in vivo* de determinación en tiempo real de los niveles de KYNA mediante microdiálisis. Como se ha reportado anteriormente, la administración sistémica del precursor kinurena (50 mg/kg, i.p.) en ratas da lugar a un rápido y significativo incremento en los niveles de KYNA extracelulares alcanzando valores máximos de 44.5 ± 3.9 nM, 2h posteriores a la administración sistémica (gráfica 11) en la corteza media prefrontal (mPFC). Para probar el efecto de NAC sobre este incremento en los niveles intracerebrales de KYNA, se perfundió NAC (20 mM) localmente mediante microdiálisis reversa por un período total de 6 h. 120 min después de iniciar la perfusión, se administró kinurena (50 mg/kg, i.p.) mientras la perfusión de NAC permaneció ininterrumpidamente por las 4 h restantes. La perfusión local con NAC redujo > 40% el incremento en los niveles extracelulares de KYNA después de administrar sistémicamente kinurena (gráfica 11).

Esto confirmó que el efecto de NAC observado *in vitro* era extrapolable a este modelo *in vivo*; la administración local de NAC en la mPFC reduce significativamente la producción *de novo* de KYNA.



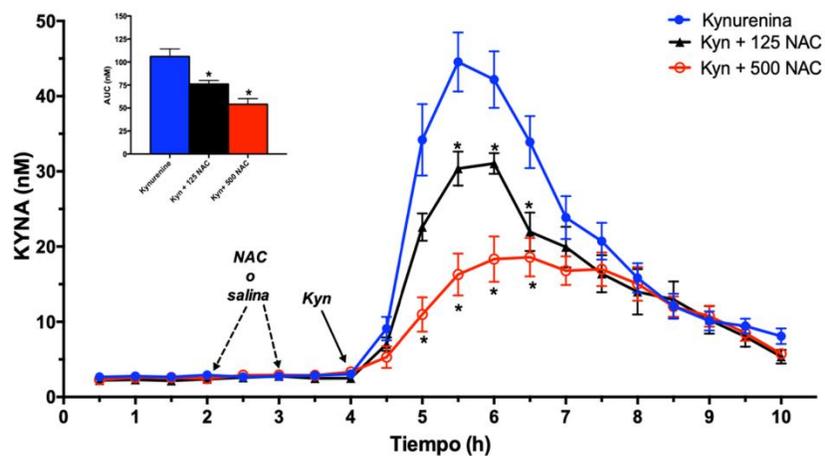
Gráfica 11. Efecto local de NAC en la producción *de novo* de KYNA en la mPFC de rata *in vivo*. Microdialísis reversa en la mPFC de ratas sin anestesiarse. Se administró localmente NAC (20 mM), transcurridos 120 min se administró kinurenina (50 mg/kg, i.p.) sistémicamente (flecha, →) mientras que la perfusión con NAC continuó por las siguientes 4h. **p < 0.05 vs. kinurenina para cada punto a través del tiempo.

6.6 LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE NAC ATENÚA LA SÍNTESIS DE KYNA EN LA mPFC DE RATA IN VIVO

Se evaluó la posibilidad de que el efecto observado al perfundir localmente NAC pudiera ser replicado aplicando una administración sistémica de NAC, ya que existe evidencia de que puede atravesar la barrera hematoencefálica. Se utilizaron dos distintas dosis de NAC 125 y 500 mg/kg administrados i.p. En línea con previos reportes (Konradsson-Geuken *et al.*, 2010; Alexander *et al.*, 2012) tras una administración sistémica de kinurenina (50 mg/kg, i.p.) los niveles extracelulares de KYNA en la mPFC alcanzaron su pico máximo (44.5 ± 3.9 nM) ($n = 10$) 2 h posteriores a la inyección (gráfica 12, círculos azules). Se realizaron pruebas piloto administrando una sola dosis de NAC 1g (1 g/kg, i.p., $n = 2$), sin embargo, esta dosis alta mostró efectos detrimentales en la conducta de la rata se observó que los costados estaban contraídos y el pelo erizado señales de disconfort general asociado a un dolor agudo; estos efectos fueron asociados a la necesidad de utilizar una cantidad considerable de hidróxido de sodio para disolver una cantidad tan alta de NAC para ajustarla a 1-2 ml de volumen de inyección. Se probó dividir la dosis en dos partes iguales, por lo que después del establecimiento de los niveles basales se administraría 500 mg/kg, i.p. y transcurrida 1 h se inyectaría la segunda dosis. Esta estrategia funcionó de manera óptima, transcurrida 1 h posterior a la segunda administración de NAC se realizó la inyección i.p. de kinurenina (50 mg/kg).

La administración de NAC (500 mg/kg) (n=7) antes de la administración de kinurenina previno el incremento en los niveles extracelulares de KYNA en un ~50% comparado con los controles que recibieron solo solución salina en lugar de NAC (gráfica 12, círculos rojos). Debido a esta evidente reducción de KYNA extracelular, exploramos la posibilidad de que el mismo efecto pudiera ser alcanzado utilizando una dosis menor de NAC (125 mg/kg, i.p.). Sin embargo, al utilizar esta dosis más baja, la reducción en los niveles de KYNA sólo fue del 20 % (gráfica 12, triángulos negros).

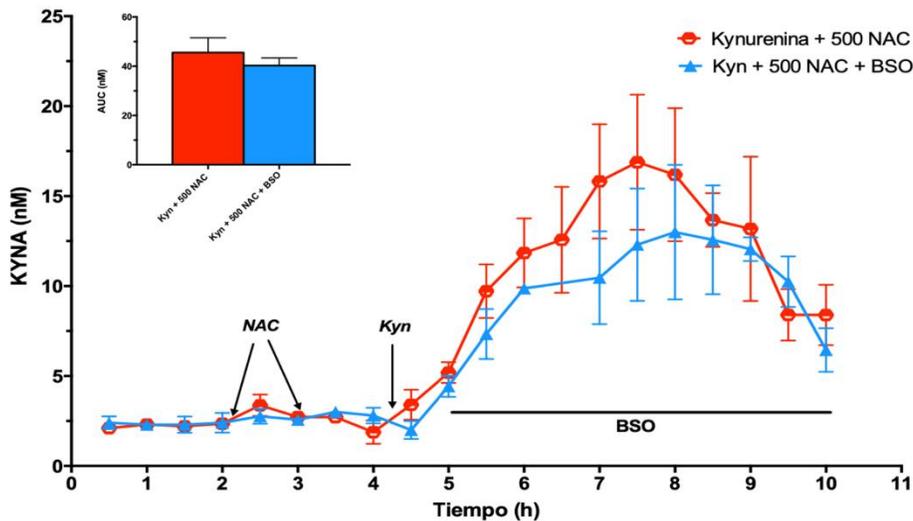
Para determinar exactamente la reducción en la concentración de KYNA en términos de molaridad, se calculó el valor del área bajo la curva (AUC) a partir de los valores de KYNA en nM acumulados durante las primeras 4 h después de la administración sistémica del precursor kinurenina: Kyn: 89 ± 16.45 nM, ; NAC (125 mg/kg) + Kyn: 77 ± 14.57 nM, and NAC (500 mg/kg) + Kyn: 48.41 ± 13.51 nM. La reducción de KYNA con la dosis de 500 mg/kg, i.p. resultó estadísticamente significativa al reducir en más del 50% la síntesis de KYNA, es decir, esta dosis previene el incremento agudo en los niveles de KYNA tras una administración sistémica de su precursor (gráfica 12).



Gráfica 12. La administración sistémica e NAC atenúa la síntesis de KYNA en la mPFC de rata *in vivo*. Después de 2 h de recolección de niveles de KYNA basales, se administró NAC (125 o 500 mg/kg, i.p.) o vehículo (solución salina 0.9%) dos veces i.p (flechas, →). Control kinureنینa: n= 10; NAC (125 mg/kg, i.p.) +Kyn: n=4; NAC (500 mg/kg, i.p.) + Kyn: n=7. *p< 0.05 vs. kinureنینa para cada punto a través del tiempo (Mann-Whitney). Se muestra un gráfico de barras que representa el Área bajo la Curva (AUC) correspondiente a la producción de KYNA (nM) posterior a la administración sistémica de kinureنینa (50 mg/kg, i.p.); **p< 0.05 vs. kinureنینa (Mann-Whitney test).

6.6.1 LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE BSO NO PREVIENE EL EFECTO DE NAC EN LOS NIVELES DE KYNA EN LA mPFC DE RATA IN VIVO

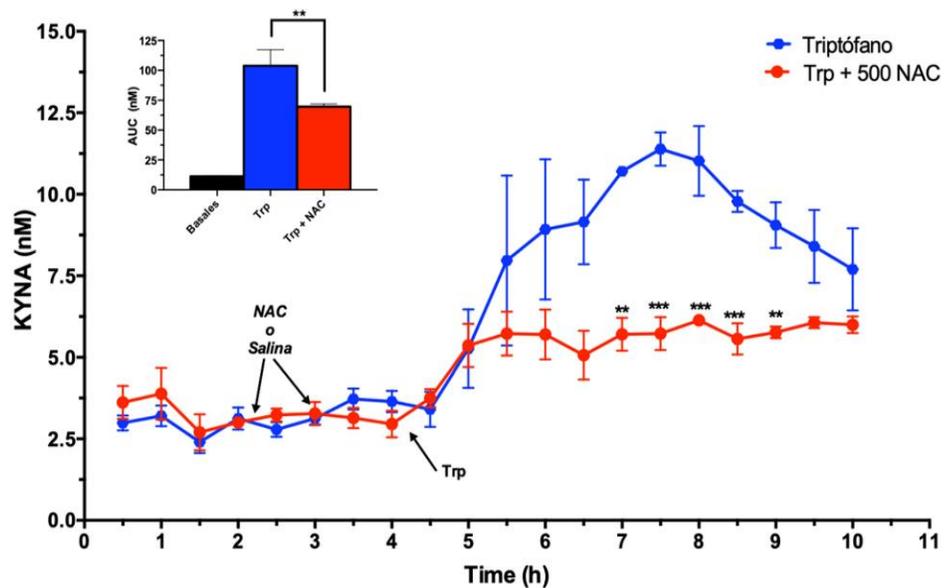
Para corroborar una vez más si el efecto de la administración de NAC en la síntesis de KYNA era independiente a la estimulación de la síntesis de GSH, se perfundió localmente el inhibidor de la síntesis de GSH, BSO. Después de recolectar los niveles basales en la mPFC se perfundió directamente BSO y de manera simultánea se administró la primera dosis i.p. de NAC (500 mg/kg, i.p.). El mismo protocolo usado anteriormente de doble administración de NAC y una sola inyección de kinurenina (50 mg/kg, i.p.) se utilizó para estos experimentos. El tratamiento con BSO no logró prevenir la reducción de los niveles de KYNA inducido por kinurenina (gráfica 13.0, triángulos azules).



Gráfica 13. BSO no previene la reducción en la síntesis de KYNA por la administración sistémica de NAC en la mPFC de rata *in vivo*. Después de 2 h de recolección de niveles de KYNA basales se inició la perfusión local de BSO (10 mM) y una administración sistémica simultánea de NAC (500 mg/kg, i.p.) (dos veces i.p; flechas, →) seguida de una administración sistémica de kinurenina. Control kinurenina: n= 10; NAC (500 mg/kg, i.p.) + Kyn: n=3 y NAC (500 mg/kg, i.p.) + BSO (10 mM)+ Kyn: n=3. Los datos se muestran como concentración en nM y las comparaciones se realizan entre tratamientos respecto a los niveles basales (2.7 ±0.14 nM). *p< 0.05 vs. kinurenina para cada punto a través del tiempo (Mann-Whitney test).

6.7 NAC ATENÚA LA SÍNTESIS DE KYNA EN LA mPFC DE RATA IN VIVO A PARTIR DEL TRIPTÓFANO

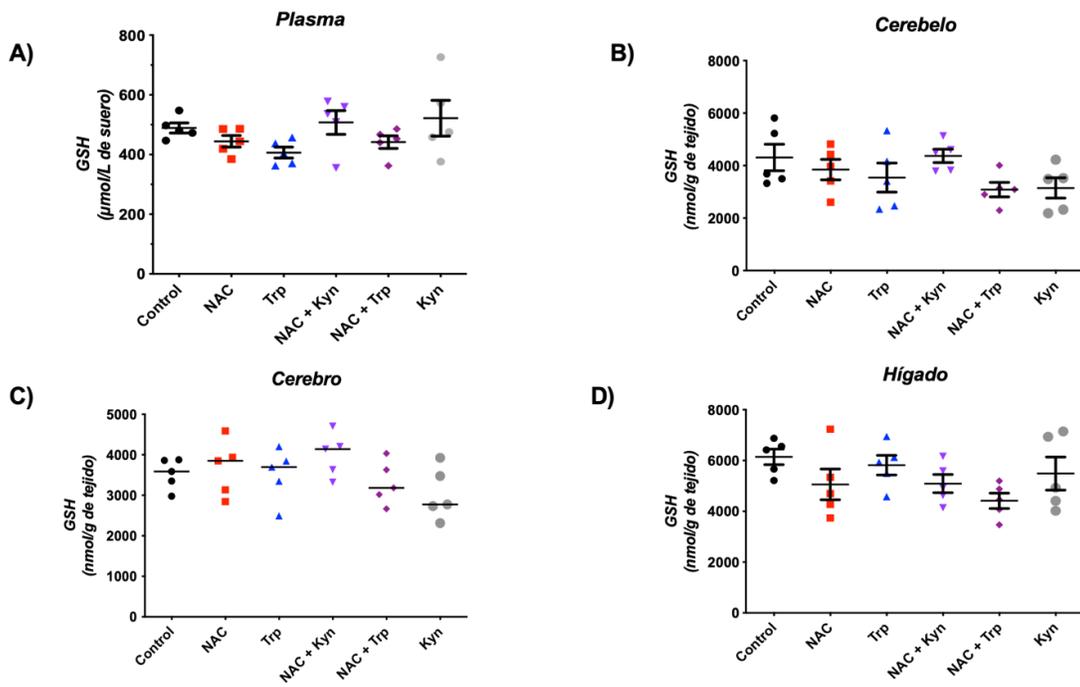
De manera paralela, se determinó si la producción de KYNA a partir de Trp también podía ser prevenida por el tratamiento con NAC (500 mg/kg, p.o.). Sin embargo, la vía de administración se modificó ya que de tener efecto podría representar una posible aplicación traslacional. Del mismo modo que con la estrategia anterior NAC se administró dos veces, 2 y 1 h antes de la administración de Trp (200 mg/kg, p.o.; gráfica 14 círculos morados). Los resultados arrojados muestran que la administración oral de NAC también logra prevenir el incremento en los niveles extracelulares de KYNA estimulados por la administración de Trp. Al calcular la concentración de KYNA correspondiente al área bajo la curva posterior a la administración oral de Trp resulta en 103.9 ± 7.8 nM mientras que sólo 69.7 ± 1.2 nM corresponde al tratamiento con NAC, lo que significó una reducción de ~30 % en los niveles extracelulares de KYNA producidos a partir de Trp.



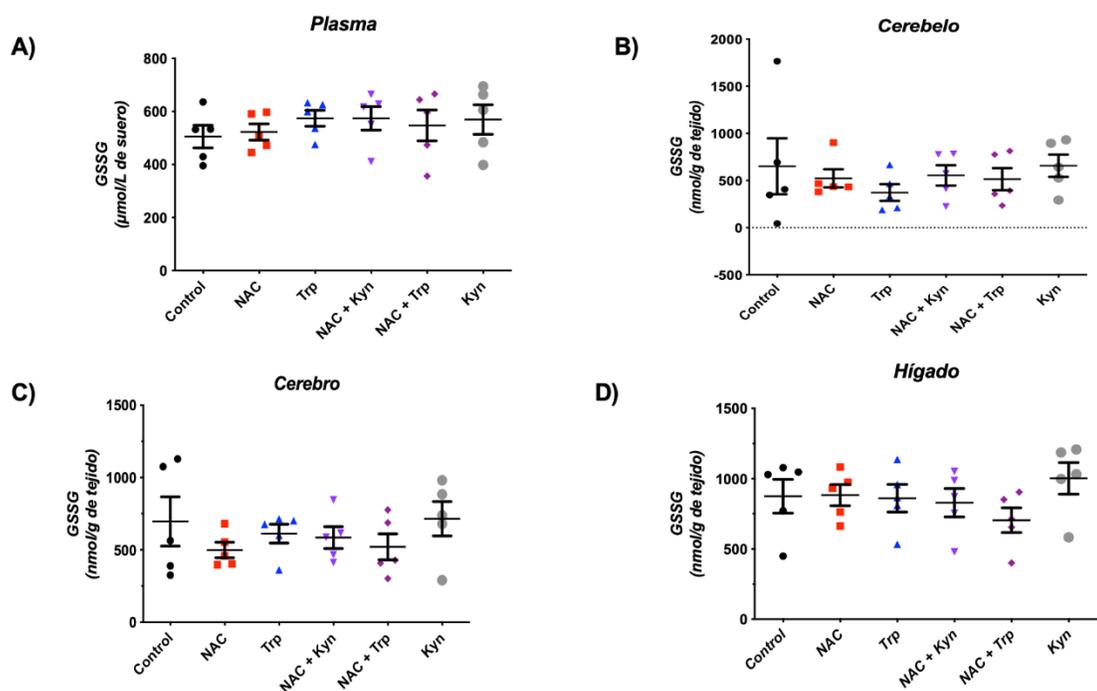
Gráfica 14. NAC atenúa la síntesis de KYNA en la mPFC de rata *in vivo* a partir de triptófano. Después de 2 h de recolección de niveles de KYNA basales, NAC (500 mg/kg, p.o.) o vehículo (solución salina 0.9%) fueron administrados dos veces oralmente (flechas, →). Control Triptófano (Trp): n= 4; NAC (500 mg/kg, p.o.) + Trp: n=4. *p< 0.05 vs. Trp para cada punto a través del tiempo (Mann-Whitney test). Se muestra un gráfico de barras que representa el Área bajo la Curva (AUC) correspondiente a la producción de KYNA (nM) posterior a la administración sistémica de Trp (200 mg/kg, p.o.); **p< 0.05 vs. Trp (Mann-Whitney test).

6.8 LOS NIVELES DE GSH TOTAL, GSH Y GSSG CUANTIFICADOS EN HÍGADO, CEREBRO, CEREBELO Y PLASMA NO INCREMENTAN TRAS LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE NAC

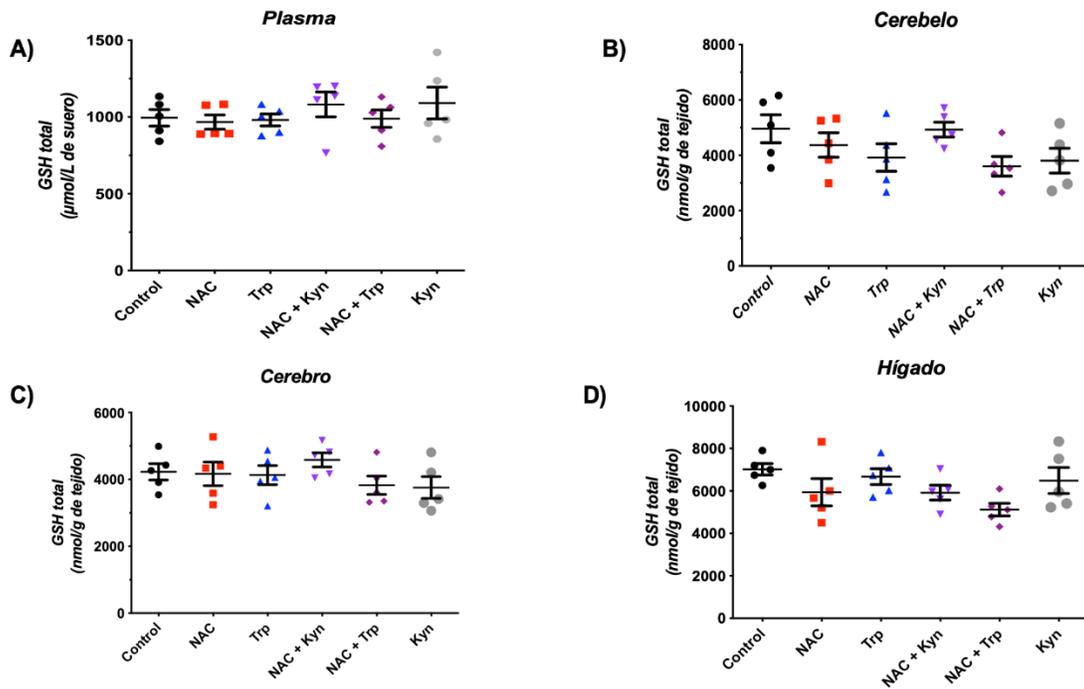
Para confirmar si el efecto *in vivo* de NAC no depende esencialmente de un incremento en la síntesis de glutatión, se realizó la cuantificación de los niveles de GSH total, GSH y GSSG posterior a la administración de NAC (500 mg/kg, i.p.) en combinación con kinurenina o Trp. Cada grupo de 6 ratas fue sacrificado 90 minutos después de la administración de kinurenina o Trp, ya que es durante ese tiempo en el que se alcanza el pico de producción de KYNA o el efecto más significativo de reducción del tratamiento con NAC. El tratamiento sistémico agudo de NAC no incrementa los niveles de glutatión en plasma ni en ninguno de los tejidos examinados. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de GSH total, GSH, GSSG o entre tratamientos y tampoco en relación a los niveles de los controles administrados sólo con el vehículo (gráficas 15, 16 y 17).



Gráfica 15. Niveles de GSH en plasma, hígado, cerebro y cerebelo de rata. Determinación fluorométrica de los niveles de GSH (GSH total menos GSSG) en A) Plasma, B) Cerebelo, C) Cerebro y D) Hígado 90 min después de los tratamientos control, NAC (500 mg/kg, i.p), Trp (200 mg/kg, p.o.), Kyn (50 mg/kg, i.p.) y la combinación de NAC + Kyn o NAC + Trp. Se muestra la distribución de los valores individuales de cada rata \pm SEM, *** $p < 0.001$ vs. niveles basales control (Mann-Whitney test).



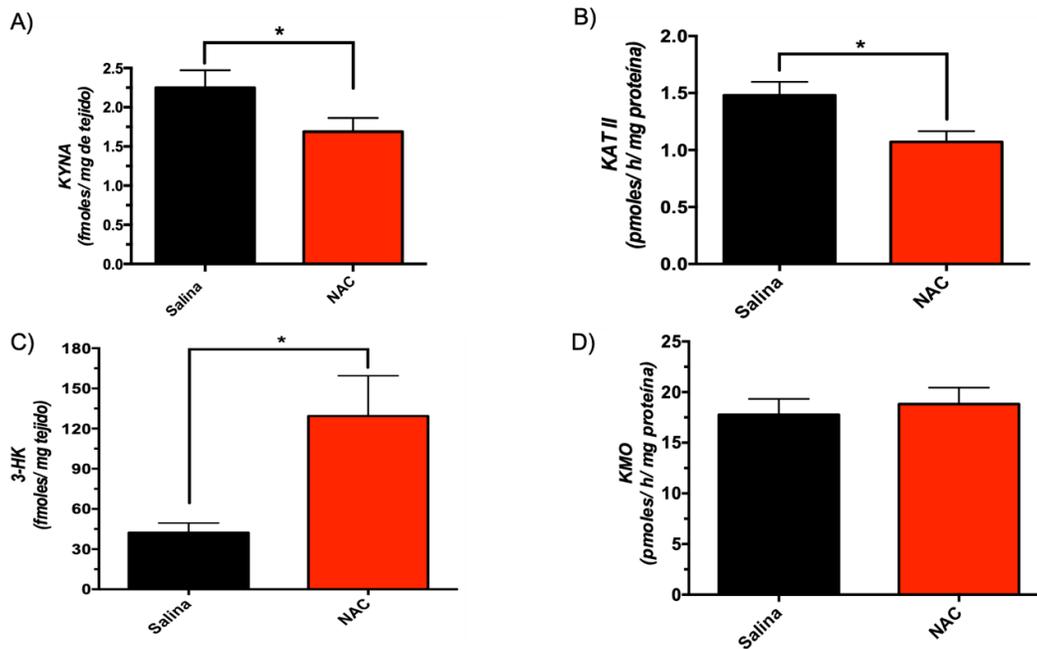
Gráfica 16. Niveles de GSSG en plasma, hígado, cerebro y cerebelo de rata. Determinación fluorométrica de los niveles de GSSG en A) Plasma, B) Cerebelo, C) Cerebro y D) Hígado 90 min después de los tratamientos control, NAC (500 mg/kg, i.p), Trp (200 mg/kg, p.o.), Kyn (50 mg/kg, i.p.) y la combinación de NAC + Kyn o NAC+ Trp. Se muestra la distribución de los valores individuales de cada rata \pm SEM de 3 experimentos independientes *** $p < 0.001$ vs. niveles basales control (Mann-Whitney test).



Gráfica 17. Niveles de GSH total en plasma, hígado, cerebro y cerebelo de rata. Determinación fluorométrica de los niveles de GSH total en A) Plasma, B) Cerebelo, C) Cerebro y D) Hígado 90 min después de los tratamientos control, NAC (500 mg/kg, i.p.), Trp (200 mg/kg, p.o.), Kyn (50 mg/kg, i.p.) y la combinación de NAC + Kyn o NAC + Trp. Se muestra la distribución de los valores individuales de cada rata \pm SEM, *** $p < 0.001$ vs. niveles basales control (Mann-Whitney test).

6.9 LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE NAC EN RATONES DISMINUYE LOS NIVELES DE KYNA, REDUCE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE KATII E INCREMENTA LOS NIVELES DE 3-HK EN CEREBRO

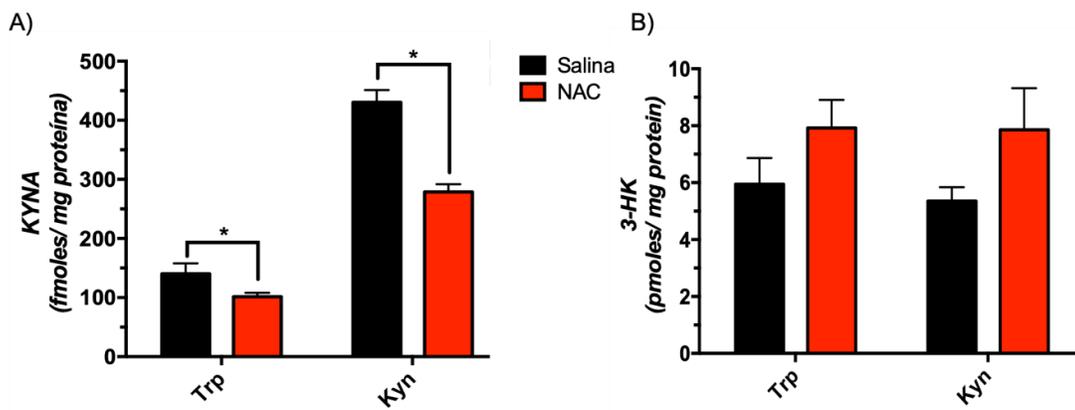
Después de determinar que la administración aguda de NAC reduce la síntesis cerebral de KYNA y dada la influencia de este metabolito en distintos procesos cognitivos, consideramos que para confirmar la relevancia fisiológica de NAC -y su efecto sobre los niveles cerebrales de KYNA- deberían evaluarse parámetros de memoria y aprendizaje. Para cumplir con este objetivo se realizó una administración subcrónica con NAC (100 mg/kg, i.p.) durante siete días en ratones FVB adultos de 10 semanas de edad y se cuantificaron los niveles basales de KYNA, la actividad enzimática de KATII, KMO así como los niveles de 3-HK, la otra rama de la vía de las kinureninas. Tal y como se ilustra en la gráfica 18 A, el tratamiento subcrónico con NAC redujo en un ~25% los niveles cerebrales endógenos de KYNA con respecto a los niveles basales (1.7 ± 0.2 vs. 2.3 ± 0.2 fmoles/mg tejido, gráfica 18B), a la par, en estos mismos tejidos cerebrales determinamos que la actividad enzimática de KATII mostraba una reducción de ~21% con respecto a la actividad basal de los controles administrados sólo con solución salina 0.9% (1.1 ± 0.1 vs. 1.4 ± 0.1 pmoles/h/mg de proteína). Paralelamente, esta inhibición de KATII favoreció significativamente el incremento en los niveles cerebrales de 3-HK (129.3 ± 30.1 vs 42.4 ± 7.1 fmoles/mg de tejido, gráfica 18 C) sin que la actividad de KMO se viera afectada (17.78 ± 11.6 vs 18.8 ± 1.6 pmoles/ h/ mg de proteína, gráfica 18D).



Gráfica 18. Niveles cerebrales de KYNA, 3HK y la actividad enzimática de KATII y KMO en ratones posterior al tratamiento subcrónico con NAC (100 mg/kg, i.p.). A) Niveles de KYNA, B) Actividad KATII, C) Niveles de 3HK, D) Actividad KMO, salina vs NAC. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de 10 animales por grupo, *p < 0.05 vs salina (comparación por pares, Mann-Whitney test).

6.9.1 EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO DE NAC REDUCE LA SÍNTESIS DE KYNA EX VIVO EN REBANADAS DE TEJIDO CEREBRAL

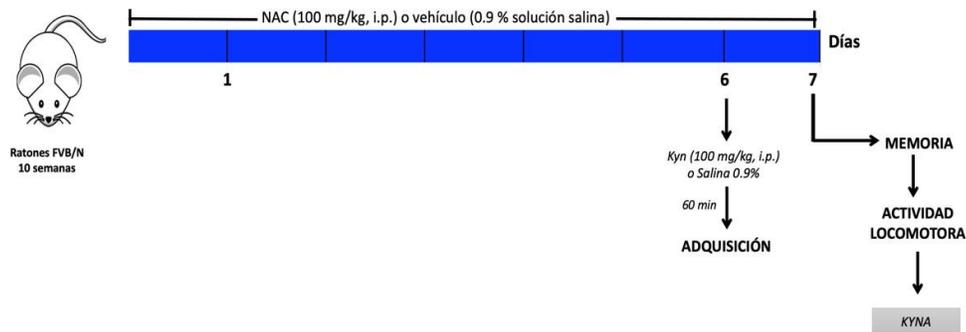
Para examinar si el efecto del tratamiento subcrónico con NAC, además de reducir los niveles endógenos de KYNA, afectaba la capacidad de estos tejidos cerebrales para producir KYNA *de novo*, se evaluaron los niveles de este metabolito producidos en rebanadas corticales a partir de su precursor inmediato kinurenina y su precursor inicial Trp (ambos a una concentración de 1 mM). Estas rebanadas corticales pre-tratadas subcrónicamente con NAC presentaron una capacidad reducida para la síntesis de KYNA a partir de Trp (NAC: 101.4 ± 6.7 fmoles/mg proteína; salina: 140.3 ± 17.5 fmoles/mg proteína, gráfica 19A) y kinurenina (NAC: 278.9 ± 12.8 fmoles/mg proteína; salina: 430.5 ± 20.7 fmoles/mg proteína, gráfica 19A). Aunque de manera no significativa ($*p > 0.05$; Mann–Whitney test), la producción *de novo* de 3-HK en estos tejidos mostró una tendencia a estar incrementada como resultado del pre-tratamiento con NAC (gráfica 19B).



Gráfica 19. Efecto del tratamiento subcrónico de NAC en la síntesis de KYNA y 3HK en rebanadas corticales de ratón. A) Niveles de KYNA, B) Niveles de 3HK. Las rebanadas corticales se obtuvieron a partir de ratones tratados subcrónicamente con NAC (100 mg/kg, i.p.) por siete días consecutivos y posteriormente incubadas en presencia de Kyn o Trp (1mM). Los datos presentados corresponden al promedio \pm SEM de 8 animales por grupo, $*p < 0.05$ vs salina (comparación por pares, Mann-Whitney test).

6.9.2 EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO DE NAC MEJORA EL RENDIMIENTO COGNITIVO EN LA PRUEBA DE MEMORIA DE ALIMENTO ENTERRADO (BFT)

Con base a la evidencia obtenida del tejido y de las rebanadas cerebrales de los ratones tratados subcrónicamente con NAC, comprobamos que este tratamiento reduce no sólo la síntesis *de novo* de KYNA a partir de Kyn o de Trp sino que además NAC redujo los niveles endógenos de KYNA cerebrales. Para evaluar si la reducción, tanto en los niveles endógenos de KYNA como en la capacidad de su síntesis cerebral, tenía alguna consecuencia sobre los parámetros cognitivos de memoria y aprendizaje, estos ratones fueron evaluados mediante la prueba de alimento enterrado (BFT). Tal y como se muestra en el siguiente esquema los ratones fueron tratados con NAC (100 mg/kg, i.p.) durante siete días consecutivos (gráfica 20).

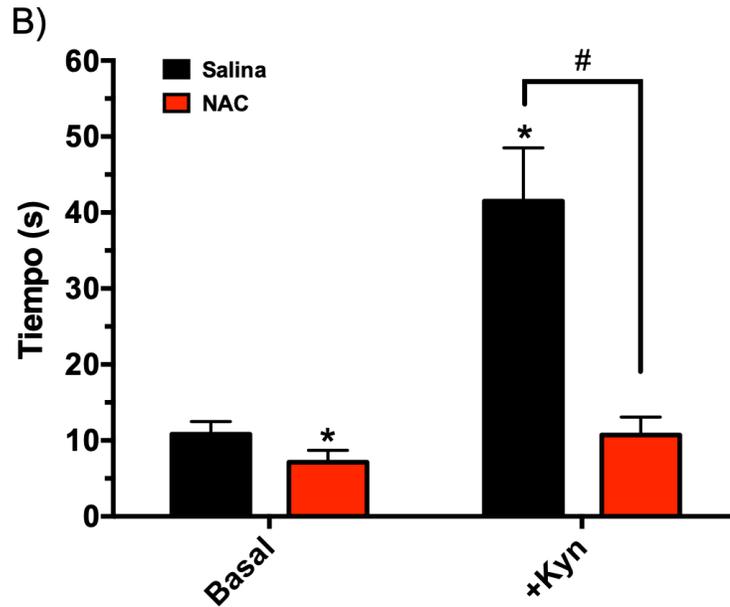
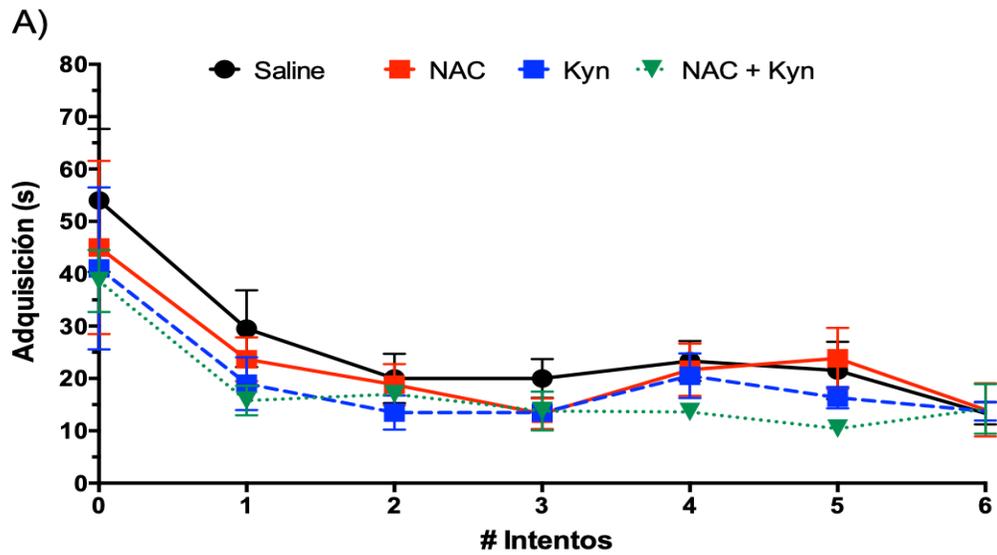


Gráfica 20. Diagrama representativo de la evaluación de memoria, aprendizaje y actividad locomotora después del tratamiento subcrónico con NAC en ratones FVB.

Se conformaron dos grupos distintos de ratones para comparar el tratamiento subcrónico con NAC respecto al vehículo (solución salina); además, se formaron dos grupos más que recibieron en el sexto día -1h antes de comenzar con su entrenamiento- una administración sistémica de Kyn (100 mg/kg, i.p.) (gráfica 21 A) a una dosis que ha sido previamente reportada como suficiente para alterar el proceso de aprendizaje y

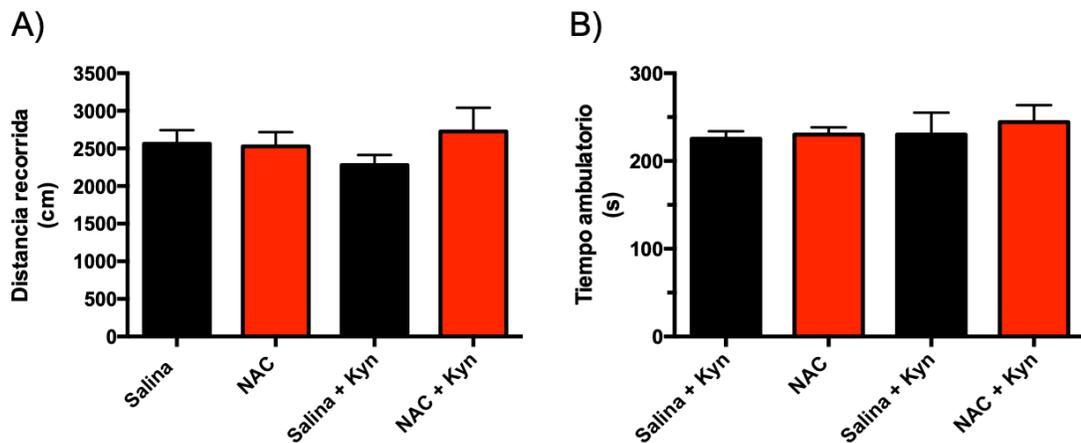
consolidación de la memoria en un paradigma de laberinto radial de 8 brazos (Chess *et al.*, 2007). En el día 6 se realizó la primera fase (fase de adquisición) de la prueba que consistió en el entrenamiento de estos animales para ubicar la recompensa (fruit loop), localizada en un lugar específico en la caja de prueba; a partir de esta sesión de entrenamiento se realizó una curva de aprendizaje que se puede observar en la gráfica 21 A). El día de entrenamiento, al evaluar todos los grupos no observamos diferencias significativas en la etapa de adquisición del paradigma para el que fueron entrenados; todos los animales de cada grupo llevaron a cabo la prueba de manera exitosa tal y como se observa en la curva de entrenamiento donde se observó claramente una reducción en el tiempo (que cada animal registró) para llegar al objetivo en el transcurso de los seis intentos (gráfica 21A). Esto nos llevó a concluir que ninguno de los tratamientos probados NAC, Kyn o la combinación de ambos afectaba la capacidad de aprendizaje de estos animales. Finalmente, 24 h después de la fase de entrenamiento, se evaluó la memoria de los distintos grupos de ratones, como parámetro principal se determinó el tiempo que le tomaba a cada ratón en llegar a la ubicación objetivo (sin el estímulo azucarado); por lo que entre más rápido encontrara esta ubicación, reflejaría un mejor desempeño en la consolidación de la memoria. Observamos en la gráfica 21B que aquellos ratones que fueron tratados con NAC subcrónicamente utilizaron un tiempo significativamente menor con respecto a los controles administrados sólo con el vehículo (7.1 ± 1.6 vs 10.8 ± 1.7 s, respectivamente). De manera mucho más marcada, mediante esta prueba se confirmó que la

administración de Kyn al inicio del entrenamiento o fase de adquisición alteró completamente la consolidación de la memoria ya que este grupo de ratones fue incapaz de dirigirse rápidamente a la ubicación objetivo; tal y como podemos observar en la gráfica 21B, el tiempo promedio que le toma a este grupo de ratones en encontrar el punto objetivo es tres veces mayor (41.5 ± 7.1 s) comparado con el grupo control (10.8 ± 1.7 s). Sin embargo, este drástico efecto en el proceso de consolidación de la memoria inducido por Kyn fue prevenido por el tratamiento subcrónico con NAC, ya que el tiempo de este grupo fue similar al grupo control (10.7 ± 2.3 s) (gráfica 21B).



Gráfica 21. Efecto del tratamiento subcrónico con NAC en la evaluación de memoria y aprendizaje mediante la prueba de BFT. A) Curva de aprendizaje o adquisición de los distintos tratamientos Salina, NAC, Kyn y NAC + Kyn; B) Evaluación de la memoria 24 h posteriores a la fase de adquisición. En el grupo Kyn estos animales fueron administrados de manera aguda (100 mg/kg, i.p.) antes de la fase de adquisición. Los datos son representados como el promedio \pm SEM (n= 5 por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías para comparar los distintos tratamientos, las diferencias entre pares de grupos se realizaron mediante la prueba de Tukey's con una significancia de * $p < 0.05$ vs salina y de # p vs Kyn.

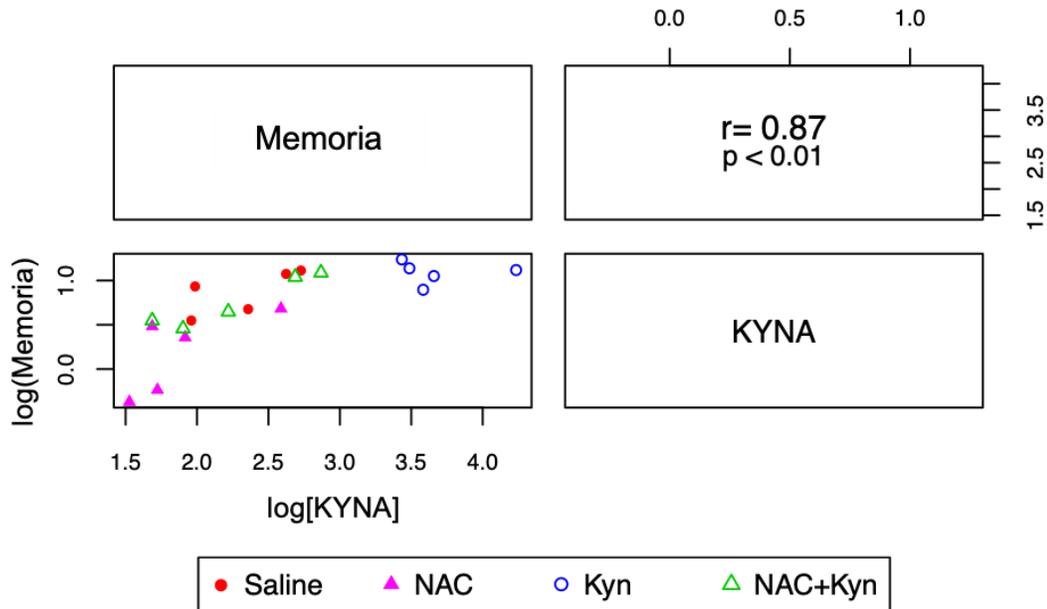
Para descartar que los tiempos determinados en la evaluación de la memoria de cada grupo experimental de ratones pudiesen estar relacionados con alguna alteración motriz que impidiera que encontraran la ubicación objetivo rápidamente, se evaluó la actividad motora de estos animales; como podemos observar en la gráfica 22, basados en la distancia total recorrida (gráfica 22A) y en el tiempo ambulatorio (gráfica 22B) no hay diferencias entre los grupos que pudieran apuntar hacia un déficit motriz.



Gráfica 22. Efecto del tratamiento subcrónico de NAC en la actividad locomotora. Inmediatamente después de la evaluación de la memoria y aprendizaje todos los grupos de ratones fueron evaluados. A) Distancia recorrida en cm; B) Tiempo ambulatorio de exploración en s.

Posteriormente, después de realizar la evaluación de memoria y aprendizaje, así como la actividad motora, se determinaron los niveles cerebrales de KYNA en cada uno de los grupos y se analizó si existía una correlación entre los niveles de KYNA y el desempeño en la prueba de memoria y aprendizaje. Los datos arrojaron que existe una correlación positiva entre la disminución en los niveles cerebrales de KYNA y una mejoría en la memoria representada en unidades de tiempo (s) (gráfica23). Es decir, en este modelo murino, el tratamiento subcrónico de NAC que logra reducir de manera significativa tanto los niveles endógenos de KYNA

como la producción *de novo* en el cerebro, estimulada por la administración sistémica de Kyn, contribuye a que los ratones tratados con NAC reduzcan el tiempo en la evaluación de la memoria por BFT (gráfica 23).

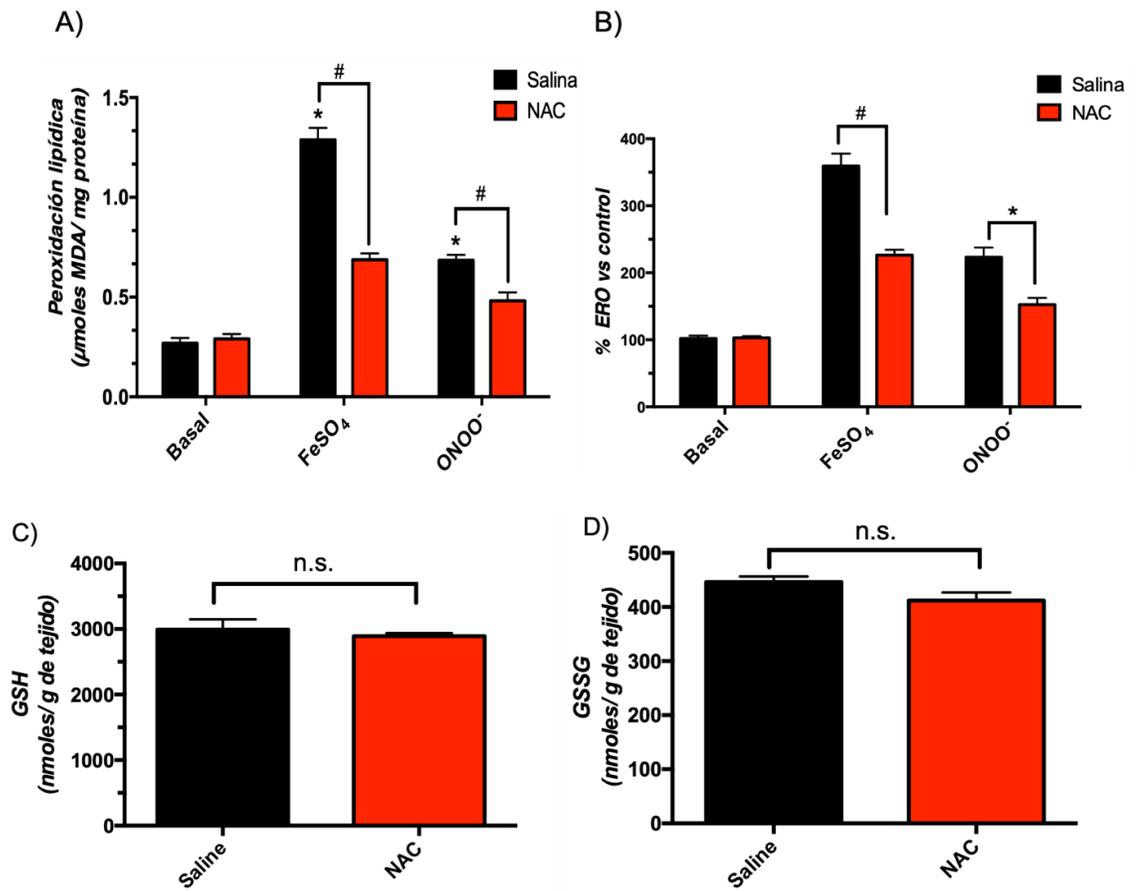


Gráfica 23. Correlación entre los niveles de KYNA y el desempeño en la memoria. La matriz ubicada en el cuadrante inferior izquierdo contiene el gráfico de dispersión de los niveles cerebrales de KYNA (fmoles/ mg de tejido) y el tiempo (s) que el animal utilizó para encontrar el objetivo (memoria). El cuadrante superior derecho contiene el valor del coeficiente de Spearman's (r) asociado a un valor p de significancia (n=5, por grupo).

6.9.3 LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE NAC REDUCE LAS ERO Y LA PL ESTIMULADA POR EL PRO-OXIDANTE FeSO₄ SIN INCREMENTAR LOS NIVELES DE GSH EN EL CEREBRO.

Finalmente, nos preguntamos si el tratamiento subcrónico de NAC podría contribuir en alguna medida al ambiente redox celular promoviendo un perfil más antioxidante. Como se observa en la gráfica 24, aquellos tejidos cerebrales que recibieron el tratamiento subcrónico de NAC resultaron más resistentes al daño oxidante inducido por FeSO₄ y ONOO⁻. En la gráfica se muestra que el tratamiento subcrónico de NAC atenúa significativamente los

niveles tanto de PL como de ERO, en los tejidos cerebrales incubados bajo condiciones pro-oxidantes (gráfica 24 A y B). Sin embargo, tal y como se había mostrado anteriormente no se registraron cambios en los niveles de GSH o GSSG en estos tejidos con el tratamiento con NAC (gráfica 24 C y D).



Gráfica 24. Niveles de ERO, PL, GSH y GSSG en el tejido cerebral ratones tratados con NAC subcrónicamente. A) Peroxidación lipídica B) Niveles de ERO con respecto al control C) Niveles de GSH D) Niveles de GSSG. Los datos corresponden al promedio \pm SEM (n=10 por grupo). Se comparó el efecto de NAC con un ANOVA de dos vías y las comparaciones múltiples en pares se realizaron con la prueba de Tukey's, * $p < 0.05$ vs. salina basal and # $p < 0.05$ vs. salina + FeSO₄ ó ONOO⁻.

7. DISCUSIÓN

Existe evidencia experimental robusta que ha puesto de manifiesto la importancia de KYNA en la función cognitiva; este efecto ha sido atribuido principalmente a su capacidad como antagonista endógeno de los receptores NMDA, además de ser un bloqueador no competitivo para el receptor α -7-nicotínico (α 7nACh, IC_{50} 1-8 μ M). Las fluctuaciones cerebrales de KYNA han demostrado tener un efecto importante sobre la concentración y la liberación de los neurotransmisores tales como Glu, DA y GABA (Pocivavsek *et al.*, 2016). Experimentalmente, se ha comprobado en cerebros de roedores que la administración local de concentraciones nanomolares de KYNA, o bien, la administración sistémica de su precursor kinurenina altera significativamente la función cognitiva. Por el contrario, la reducción de los niveles cerebrales de este metabolito, mediante el uso de inhibidores específicos o de modelos genéticos que carecen de la enzima KATII, mejoran la función cognitiva. Dada la importancia de modular los niveles endógenos de KYNA y sus efectos en la neurotransmisión y por ende en la función cognitiva, la búsqueda de compuestos capaces de reducir estos niveles especialmente en contextos patológicos de neurodegeneración o desórdenes psiquiátricos -en donde se encuentran elevados- ha sido constante; se han desarrollado varios inhibidores, sin embargo, muchos de ellos tienen la desventaja de no poder cruzar la BHE o que su síntesis farmacológica resulta costosa. Por lo que la búsqueda de nuevos fármacos que puedan disminuir los niveles de KYNA no ha cesado.

Aunado a la inhibición enzimática, existen vías alternativas de formación de KYNA que dependen de un ambiente oxidante que favorezca la formación

espontánea de KYNA a partir de la interacción directa entre kinurenina y las ERO sin la intervención enzimática de alguna aminotransferasa (Blanco-Ayala *et al.*, 2015; Zsizsik & Hardeland, 2002).

Nuestro grupo de trabajo se ha centrado en la caracterización de estas vías alternativas de formación de KYNA. Por lo que, resultaba factible pensar que un tratamiento antioxidante podría ser capaz de reducir los niveles de KYNA a través de la reducción de los niveles de ERO y la estimulación de los sistemas antioxidantes endógenos. El presente estudio incluyó distintas aproximaciones experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, orientadas a evaluar el efecto de los antioxidantes NAC y GSH en la síntesis y en los niveles endógenos cerebrales de KYNA. Nuestros resultados *in vitro* arrojaron que, tanto en homogenados cerebrales como en rebanadas corticales de rata, la incubación con NAC resulta en una reducción concentración-dependiente en la producción de KYNA, sin embargo, bajo las mismas condiciones la incubación directa con GSH no demostró tener el mismo efecto. Incluso, al cuantificar los niveles de GSH producidos en estas rebanadas, la síntesis de este antioxidante sólo fue estimulada con la concentración más alta de NAC (20 mM), sin embargo, el efecto en la producción de KYNA por NAC sucedía a partir de concentraciones menores, NAC 2 mM redujo en ~ 40% la producción *de novo* de KYNA. El claro efecto de NAC *in vitro* sobre los niveles de KYNA indicaban que tal vez el efecto pro-cognitivo observado en otros modelos podría estar asociado a eventos independientes a la estimulación de la síntesis de GSH.

De hecho, se ha descrito anteriormente que NAC tiene efectos en la modulación dopaminérgica y glutamatérgica (Dean *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2018), efecto observado en la producción *de novo* de KYNA apunta a que este podría ser otro mecanismo mediante el cual NAC pueda ejercer esta modulación en la neurotransmisión.

Posteriormente, decidimos explorar si la reducción en la síntesis de KYNA involucraba también una reducción en la actividad enzimática de KATII inducida por NAC. En otros contextos, se ha determinado que NAC puede ejercer una acción inhibitoria de manera dosis-dependiente en la actividad enzimática de enzimas como las hialuronidasas testiculares -con un rol esencial durante la fertilización-, en donde tanto la evidencia experimental *in vitro* como la simulación por dinámica molecular sugieren que NAC ejerce una inhibición no-competitiva que involucra la acción de los grupos tioles presentes en NAC y su interacción con las cisteínas presentes en la enzima (Sunitha *et al.*, 2013). Con base en esta evidencia decidimos explorar la posibilidad de que NAC pudiera reducir la actividad de la enzima KATII, para esto utilizamos distintas aproximaciones *in vitro*. En homogenados de cerebro de rata confirmamos que NAC inhibe de manera concentración-dependiente la actividad enzimática de KATII; y de manera más específica, haciendo uso de una enzima humana recombinante de KATII, se determinó un significativo efecto inhibitorio, NAC inhibió a KATII con un IC₅₀ de 500 µM. Habiendo confirmado la capacidad inhibitoria de NAC sobre KATII, se prosigió a determinar si el efecto de NAC en la síntesis de KYNA podía ser replicado en un modelo *in vivo* de microdiálisis en donde tanto la administración local como la administración sistémica de NAC logró

prevenir de manera significativa el rápido incremento en los niveles extracelulares de KYNA tras una administración sistémica de kinurenina en la mPFC. Para descartar que este efecto *in vivo* de NAC dependiera de la estimulación en la síntesis de GSH, se cuantificaron los niveles tanto de GSH como de GSSG en cerebro, cerebelo, plasma e hígado sin que éstos tuvieran diferencias significativas con respecto a aquellos animales que sólo recibieron el vehículo (solución salina). Adicionalmente, utilizando este mismo modelo *in vivo* se administró localmente un inhibidor de la síntesis de GSH, BSO, observando que la reducción de KYNA no fue prevenida por la administración sistémica de NAC. Esta evidencia apunta que la administración aguda de NAC durante este lapso de tiempo no es suficiente para incrementar de manera significativa los niveles de GSH, especialmente en cerebro, y tampoco de manera periférica tal como se observa en la cuantificación en plasma e hígado; por lo que el efecto de NAC en los niveles de KYNA durante el análisis *in vivo* en la microdiálisis resulta independiente de la estimulación de la síntesis de GSH. Nuestros resultados, en su conjunto demuestran que los efectos pro-cognitivos de NAC, los cuales sistemáticamente se han asociado a un incremento en la neurotransmisión glutamatergica, pueden estar relacionados con la capacidad inhibitoria que ejerce sobre KATII que tendría como consecuencia la disminución en los niveles cerebrales de KYNA y con ello el incremento en los niveles de Glu. Además, el hecho de que NAC interfiera con la síntesis de KYNA fortalece la idea de que los astrocitos tienen un papel relevante en los efectos reportados para NAC en el cerebro; esto resulta factible basados en la evidencia que

muestra que cuando NAC se encuentra en el medio extracelular del tejido cerebral éste se acumula especialmente en los astrocitos (Kranich *et al.*, 1998); adicionalmente, estas células también resultan ser esenciales para la producción de GSH y su precursor L-cisteína, el producto deacetilado de NAC (Hertz & Zielke, 2004; Raps *et al.*, 1989). Sin embargo, este mecanismo de inhibición no debiera ser considerado como el único involucrado en sus efectos pro-cognitivos ya que en contextos patológicos específicos como la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson (BavarsadShahripour *et al.*, 2014), en donde los niveles de GSH están particularmente disminuídos, la acción de NAC podría también incluir la restauración del balance redox celular mediante el incremento en los niveles de GSH intracelulares, la reducción de citocinas pro-inflamatorias (Tsai *et al.*, 2009) y la reducción del estrés oxidante asociado a estas enfermedades (Csontos *et al.*, 2012).

Para explorar los distintos mecanismos por los cuales NAC podría estar ejerciendo sus efectos pro-cognitivos decidimos probar una administración subcrónica de NAC durante 7 días en ratones adultos. Al evaluar el efecto del tratamiento subcrónico en el tejido cerebral de estos animales determinamos que NAC redujo de manera significativa los niveles endógenos de KYNA y redujo la actividad de KATII; adicionalmente, al explorar la rama alterna de la VK encargada de producir el poder reductor de NAD⁺, observamos que los niveles de 3-HK incrementaron sin que esto implicara un incremento en la actividad enzimática de la enzima que produce este metabolito, la KMO. Aunado a esto, también comprobamos en estos mismos tejidos, que la capacidad de síntesis de KYNA - de manera similar

al tratamiento agudo con NAC- se encontraba disminuída, ya que aquellos tejidos tratados con NAC, al ser incubados ya sea con el precursor kinurenina o triptófano, produjeron significativamente menores niveles de KYNA. Es decir, el tratamiento subcrónico de NAC no sólo afecta la síntesis

de KYNA sino que además reduce los niveles endógenos cerebrales de este metabolito. En paralelo, determinamos si esta disminución tanto en los niveles endógenos de KYNA, así como en la capacidad de producir KYNA *de novo* podían impactar en el desempeño cognitivo durante un paradigma conductual que evaluara memoria y aprendizaje. Mediante el uso de la prueba BFT, pusimos a prueba el tratamiento subcrónico de NAC comparándolo con los controles que sólo recibieron solución salina. Aquellos animales que recibieron un tratamiento continuo de NAC presentaron el mismo patrón de aprendizaje que los controles de salina, es decir, NAC no altera el proceso de adquisición de la memoria durante la etapa de entrenamiento. Sin embargo, al evaluar la memoria 24 h después observamos que el grupo de NAC presentó mejores tiempos al momento de localizar específicamente el lugar objetivo comparado con el grupo control. Subsecuentemente, para hacer más evidente el efecto de NAC sobre este paradigma y su relación con la reducción en los niveles de KYNA, comparamos dos grupos de ratones. El primer grupo había sido administrado subcrónicamente sólo con el vehículo pero, en el sexto día de tratamiento y 1h antes de la fase de entrenamiento, fueron administrados sistémicamente con una dosis aguda de kinurenina (100 mg/kg, i.p.); esta dosis ha sido probada anteriormente en otros contextos experimentales en donde se ha

demostrado que a través de esta administración los niveles de KYNA incrementan drásticamente de una manera rápida y sostenida hasta por 6 h, y que aunado a estos incrementos anormales en KYNA (más de 20 veces sobre los niveles endógenos basales) el proceso de consolidación de la memoria en roedores se altera significativamente. Cabe resaltar que este grupo aprendió de manera favorable el paradigma de prueba, sin embargo,

durante la evaluación de la memoria se observó que éstos animales eran incapaces de encontrar eficazmente dónde estaba ubicada la posición objetivo, esto se vio reflejado en el tiempo en el que tardaron en llegar a ese punto y en el comportamiento errático y poco dirigido, dando indicios claros de que no recordaban la tarea adquirida el día anterior; el tiempo que les tomó a estos ratones en llegar al punto de referencia fue tres veces mayor con respecto a los controles que no recibieron kinurenina. Sin embargo, de manera interesante, en el segundo grupo, el tratamiento subcrónico con NAC previno que estas alteraciones observadas en el grupo kinurenina se presentaran, ya que el tiempo que les tomó a estos ratones para encontrar el punto de referencia fue muy similar al control, es decir, estos ratones recordaban con mayor eficiencia el punto de referencia; NAC previno las alteraciones en la consolidación de la memoria inducidas por kinurenina. Las alteraciones motrices en cada uno de los grupos fueron descartadas después de que no encontramos diferencias significativas en la actividad motora de estos roedores. Una vez concluida la evaluación cognitiva y motora comprobamos que estos tejidos presentaban niveles reducidos de KYNA de manera endógena, la actividad enzimática de KATII se encontraba disminuida y los niveles de 3-HK se encontraban incrementados. Se

determinó que existía una correlación positiva entre los niveles disminuidos de KYNA y un mejor rendimiento cognitivo en este paradigma conductual. Aunado a esto pudimos también confirmar que, aunque los niveles de GSH no se encontraban incrementados en estos animales tras el tratamiento subcrónico de NAC, este tratamiento si mejora el perfil antioxidante cerebral. Esto fue corroborado al exponer el tejido cerebral de ratones pretratados subcrónicamente con NAC a estímulos pro-oxidantes, donde mostraron ser más resistentes al daño oxidante con respecto a los controles. De gran importancia es resaltar que la modulación ejercida por NAC en los niveles cerebrales de KYNA se traduce en un mejor desempeño en los procesos asociados a la consolidación de la memoria, confirmando que NAC podría ser un potencial fármaco en el tratamiento de procesos de declive cognitivo asociados al envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos en los cuales el aumento de KYNA y el estrés oxidante son factores comunes.

8. CONCLUSIONES

En conjunto, nuestros datos ponen de manifiesto un nuevo mecanismo mediante el cual NAC puede incidir en la transmisión glutamatérgica y colinérgica: su acción inhibitoria sobre la producción de KYNA, la cual se debe tanto a la inhibición de la principal enzima encargada de su síntesis, la KATII, así como al mejoramiento del perfil redox celular. Además, confirmamos que el efecto observado sobre los niveles de KYNA cerebrales es independiente a la síntesis de GSH a través de NAC, ya que en ningún caso observamos un incremento en sus niveles. El mejoramiento del perfil redox celular en el tejido cerebral de aquellos ratones que recibieron NAC podría atribuirse entonces a la capacidad antioxidante *per se* de este fármaco, esta capacidad resulta particularmente relevante en contextos neuropatológicos en donde el estrés oxidante es un importante factor para la progresión de distintas enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos con un marcado deterioro cognitivo. Finalmente, ya que la inhibición de KATII y la modulación de los niveles cerebrales de KYNA han sido propuestas como una estrategia novedosa para contrarrestar los déficits cognitivos observados en distintos desórdenes psiquiátricos, particularmente en esquizofrenia y depresión, NAC podría ser una excelente herramienta farmacológica de modulación de los niveles cerebrales de KYNA con el potencial translacional de ser un tratamiento seguro y de bajo costo para aminorar el deterioro cognitivo observado en estas y otras enfermedades neurológicas.

9. REFERENCIAS

1. Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., & Sergio, F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research*, 52(7), 751–762.
2. Alexander, K. S., Wu, H. Q., Schwarcz, R., & Bruno, J. P. (2012). Acute elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility: Normalization by the $\alpha 7$ positive modulator galantamine. *Psychopharmacology*, 220(3), 627–637.
3. Amori, L., Wu, H. Q., Marinozzi, M., Pellicciari, R., Guidetti, P., & Schwarcz, R. (2009). Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum. *Neuroscience*, 159(1), 196–203.
4. Amori, L., Guidetti, P., Pellicciari, R., Kajii, Y., & Schwarcz, R. (2009). On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 109(2), 316–325.
5. Aoyama, K., Suh, S. W., Hamby, A. M., Liu, J., Chan, W. Y., Chen, Y., & Swanson, R. A. (2006). Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature Neuroscience*, 9(1), 119–126.
6. Baran, H., Jellinger, K., & Deicke, L. (1999). Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 106(2), 165–181.
7. Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior*, 4(2), 108–122.
8. Beggiato, S., Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tanganelli, S., Fuxe, K., Schwarcz, R., & Ferraro, L. (2013). Kynurenic acid, by targeting $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, modulates extracellular GABA levels in the rat striatum in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 37(9), 1470–1477.

9. Beggiano, S., Tanganelli, S., Fuxe, K., Antonelli, T., Schwarcz, R., & Ferraro, L. (2014). Endogenous kynurenic acid regulates extracellular GABA levels in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, *82*, 11–18.
10. Berk, M., Malhi, G. S., Gray, L. J., & Dean, O. M. (2013). The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*. (3), 167-177.
11. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9–19.
12. Blanco Ayala, T., Lugo Huitrón, R., Carmona Aparicio, L., Ramírez Ortega, D., González Esquivel, D., Pedraza Chaverrí, J., Pérez de la Cruz, V. (2015). Alternative kynurenic acid synthesis routes studied in the rat cerebellum. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 178.
13. Chess, A. C., Landers, A. M., & Bucci, D. J. (2009). L-kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue- specific fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, *201* (2), 325-331.
14. Chess, A. C., Simoni, M. K., Alling, T. E., & Bucci, D. J. (2007). Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophrenia Bulletin*, *33*(3), 797–804.
15. Christen, S., Peterhans, E., & Stocker, R. (1990). Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(7), 2506–2510.
16. Csontos, C., Rezman, B., Foldi, V., Bogar, L., Drenkovics, L., Röth, E., Lantos, J. (2012). Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. *Burns*, *38*(3), 428–437.
17. Dean, O., Giorlando, F., & Berk, M. (2011). N-acetylcysteine in psychiatry: Current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *36* (2), 78-86.

18. Dijkman, U. (2010). Inhibition of Kynurenine aminotransferase: a potential new drug target for the treatment of schizophrenia. (Tesis de Doctorado, Universidad de Goningen).
19. Dringen, R. (1999). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 116, 33–57.
20. Erhardt, S, Schwieler, L., & Engberg, G. (2003). Kynurenic acid and schizophrenia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527, 155–165.
21. Erhardt, S., Schwieler, L., Emanuelsson, C., & Geyer, M. (2004). Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biological Psychiatry*, 56(4), 255–260.
22. Erhardt, S., Schwieler, L., Nilsson, L., Linderholm, K., & Engberg, G. (2007). The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiology and Behavior*, 92(1–2), 203–209.
23. Foster, A. C., Vezzani, A., French, E. D., & Schwarcz, R. (1984). Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neuroscience Letters*, 48(3), 273–278.
24. Fujigaki, H., Yamamoto, Y., & Saito, K. (2017). L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology*, 112, 264–274.
25. Fülöp, F., Szatmári, I., Vámos, E., Zádori, D., Toldi, J., & Vécsei, L. (2009). Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 16(36), 4828–4842.
26. Giles, G. I., Collins, C. a, Stone, T. W., & Jacob, C. (2003). Electrochemical and *in vitro* evaluation of the redox-properties of kynurenine species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(3), 719–724.

27. Giorgini, F., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Thomas, M. A. R., Tararina, M., Muchowski, P. J. (2013). Targeted deletion of kynurenine 3-Monooxygenase in mice a new tool for studying kynurenine pathway metabolism in periphery and brain. *Journal of Biological Chemistry*, 288(51), 36554–36566.
28. Goda, K., Hamane, Y., Kishimoto, R., & Ogishi, Y. (1999). Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 397–402.
29. González Esquivel, D., Ramírez-Ortega, D., Pineda, B., Castro, N., Ríos, C., & Pérez de la Cruz, V. (2017). Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. *Neuropharmacology*, 112, 331–345.
30. Gramsbergen, J. B., Hodgkins, P. S., Rassoulpour, a, Turski, W. a, Guidetti, P., & Schwarcz, R. (1997). Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. *Journal of Neurochemistry*, 69(1), 290–298.
31. Guidetti, P., Okuno, E., & Schwarcz, R. (1997). Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *Journal of Neuroscience Research*, 50(3), 457–465.
32. Gosker, H. R., Clarke, G., de Theije, C. C., Cryan, J. F., & Schols, A. (2019). Impaired Skeletal Muscle Kynurenine Metabolism in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of clinical medicine*, 8(7), 915.
33. Guo, N., McIntosh, C., & Shaw, C. (1992a). Glutathione: New candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience*, 51(4), 835–842.
34. Guo, N., & Shaw, C. (1992b). Characterization and localization of glutathione binding sites on cultured astrocytes. *Molecular Brain Research*, 15(3–4), 207–215.
- 35.

36. Han, Q., Robinson, H., Cai, T., Tagle, D. a, & Li, J. (2009). Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III. *Molecular and Cellular Biology*, 29(3), 784–793.
37. Hertz, L., & Zielke, H. R. (2004). Astrocytic control of glutamatergic activity: Astrocytes as stars of the show. *Trends in Neurosciences*, 27(12), 735–743.
38. Hilmas, C., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7463–7473.
39. Huang, Y. S., Ogbechi, J., Clanchy, F. I., Williams, R. O., & Stone, T. W. (2020). IDO and Kynurenine Metabolites in Peripheral and CNS Disorders. *Frontiers in immunology*, 11, 388.
40. Iaccarino, H. F., Suckow, R. F., Xie, S., & Bucci, D. J. (2013). The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 150(2–3), 392–397.
41. Janáky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B. A., Bains, J. S., Oja, S. S., Yoneda, Y., & Shaw, C. A. (1999). Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *Journal of Neurochemistry*, 73(3), 889–902.
42. Kiss, C., Ceresoli-Borroni, G., Guidetti, P., Zielke, C. L., Zielke, H. R., & Schwarcz, R. (2003). Kynurenate production by cultured human astrocytes. *Journal of Neural Transmission*, 110(1), 1–14.
43. Konradsson-Geuken, Å., Wu, H. Q., Gash, C. R., Alexander, K. S., Campbell, A., Sozeri, Y., Bruno, J. P. (2010). Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience*, 169(4), 1848–1859.
44. Koola, M. M. (2016). Kynurenine pathway and cognitive impairments in schizophrenia: Pharmacogenetics of galantamine and memantine. *Schizophrenia Research: Cognition*, 4, 4–9.

45. Kranich, O., Dringen, R., Sandberg, M., & Hamprecht, B. (1998). Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: Preference for cystine. *Glia*, 22(1), 11–18.
46. Lehmkuhl, A. M., Dirr, E. R., & Fleming, S. M. (2014). Olfactory assays formouse models of neurodegenerative disease. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (90), e51804.
47. Lovelace, M. D., Varney, B., Sundaram, G., Lennon, M. J., Lim, C. K., Jacobs, K., ... Brew, B. J. (2017). Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology*, 112, 373–388.
48. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*.
49. Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñiz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverrí, J., Silva-Adaya, D., Pérez de La Cruz, V. (2008). On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(5), 538–547.
50. Lushchak, V. I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1–26.
51. Moroni, F., Cozzi, A., Sili, M., & Mannaioni, G. (2012). Kynurenic acid: A metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *Journal of Neural Transmission*, 119(2), 133–139.
52. Ooi, S. L., Green, R., & Pak, S. C. (2018). N-Acetylcysteine for the Treatment of Psychiatric Disorders: A Review of Current Evidence. *BioMed Research International*, 2018, 2469486.
53. Parsons, J. L., & Chipman, J. K. (2000). The role of glutathione in DNA damage by potassium bromate in vitro. *Mutagenesis*, 15(4), 311–316.
54. Passera, E., Campanini, B., Rossi, F., Casazza, V., Rizzi, M., Pellicciari, R., & Mozzarelli, A. (2011). Human kynurenine

55. aminotransferase II - Reactivity with substrates and inhibitors. *FEBS Journal*, 278(11), 1882–1900.
56. Pellicciari, R., Venturoni, F., Bellocchi, D., Carotti, A., Marinozzi, M., Macchiarulo, A., Schwarcz, R. (2008). Sequence variants in kynurenine aminotransferase II (KAT II) orthologs determine different potencies of the inhibitor S-ESBA. *ChemMedChem*, 3(8), 1199–1202.
57. Pérez-De La Cruz, V., Königsberg, M., & Santamaría, A. (2007). Kynurenine pathway and disease: an overview. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 6(6), 398–410.
58. Pérez-González, A., Alvarez-Idaboy, J. R., & Galano, A. (2015). Free-radical scavenging by tryptophan and its metabolites through electron transfer based processes. *Journal of Molecular Modeling*, 21(8), 213.
59. Perkins, M. N., & Stone, T. W. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Research*, 247(1), 184–187.
60. Peyrot, F., & Ducrocq, C. (2008). Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Pineal Research*, 45, 235–246.
61. Pocivavsek, A., Wu, H. Q., Potter, M. C., Elmer, G. I., Pellicciari, R., & Schwarcz, R. (2011). Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2357–2367.
62. Pocivavsek, A., Notarangelo, F. M., Wu, H. Q., Bruno, J. P., & Schwarcz, R. (2016). Astrocytes as Pharmacological Targets in the Treatment of Schizophrenia: Focus on Kynurenic Acid. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*.
63. Poeggeler, B., Pappolla, M. A., Hardeland, R., Rassoulpour, A., Hodgkins, P. S., Guidetti, P., & Schwarcz, R. (1999). Indole-3-propionate: A potent hydroxyl radical scavenger in rat brain. *Brain Research*, 815(2), 382–388.
64. Politi V., Lavaggi M. V., Di Stazio G., M. A. (1991). Kynurenine and Serotonin Pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

- (1^a Ed.). Nueva York, EUA, Plenum press, 515–518
65. Schwarcz, R., Young, S., & Brown, R. (1991). Kynurenine and Serotonin Pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (1^a Ed.). Nueva York, EUA, Plenum press, 1–715.
66. Potter, M. C., Elmer, G. I., Bergeron, R., Albuquerque, E. X., Guidetti, P., Wu, H.-Q., & Schwarcz, R. (2010). Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology*, 35(8), 1734–1742.
67. Raju, T. N., Kanth, V. R., Maheswara Reddy, U. P., Srinivas, J., & Sobhanaditya, J. (2007). Influence of kynurenines in pathogenesis of cataract formation in tryptophan-deficient regimen in wistar rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(6), 543–548.
68. Raps, S. P., Lai, J. C. K., Hertz, L., & Cooper, A. J. L. (1989). Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Research*, 493(2), 398–401.
69. Rassoulpour, A., Wu, H. Q., Ferre, S., & Schwarcz, R. (2005). Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 93(3), 762–765.
70. Réus, G. Z., Jansen, K., Titus, S., Carvalho, A. F., Gabbay, V., & Quevedo, J. (2015). Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *Journal of Psychiatric Research*, 68(May), 316–328.
71. Reyes Ocampo, J., Lugo Huitrón, R., González-Esquivel, D., Ugalde-Muñiz, P., Jiménez-Anguiano, A., Pineda, B., Pérez De La Cruz, V. (2014). Kynurenines with neuroactive and redox properties: Relevance to aging and brain diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 646909.
72. Rózsa, É., Robotka, H., Vécsei, L., & Toldi, J. (2008). The Janus-face kynurenic acid. *Journal of Neural Transmission*, 115(8), 1087–1091.
73. Savitz, J. (2020). The kynurenine pathway: a finger in every pie.

- Molecular Psychiatry*, 25(1), 131–147.
74. Schwarcz, R. (2016). Kynurenines and Glutamate. Multiple Links and Therapeutic Implications. *Advances in Pharmacology*. San Diego, California, EUA. (1a ed), 76, 13-37.
75. Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., & Wu, H.-Q. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(7), 465–477.
76. Senft, A. P., Dalton, T. P., & Shertzer, H. G. (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 280(1), 80–86.
77. Shepard, P. D., Joy, B., Clerkin, L., & Schwarcz, R. (2003). Micromolar brain levels of kynurenic acid are associated with a disruption of auditory sensory gating in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 28(8), 1454–1462.
78. Stone, T W. (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacological Reviews*, 45(3), 309–379.
79. Stone, Trevor W., & Darlington, L. G. (2013). The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders. *British Journal of Pharmacology*, 169(6), 1211–1227.
80. Stone, Trevor W, & Darlington, L. G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(8), 609–620.
81. Sunitha, K., Suresh, P., Santhosh, M. S., Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Marathe, G. K., Girish, K. S. (2013). Inhibition of hyaluronidase by N-acetylcysteine and glutathione: Role of thiol group in hyaluronan protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 39–46.
82. Swartz, K. J., During, M. J., Freese, A., & Beal, M. F. (1990). Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(9), 2965–2973

83. Tanaka, M., Bohár, Z., & Vécsei, L. (2020). Are Kynurenines Accomplices or Principal Villains in Dementia? Maintenance of Kynurenine Metabolism. *Molecules*, 25(3), 564.
84. Tarasov, V. V., Svistunov, A. A., Chubarev, V. N., Sologova, S. S., Mukhortova, P., Levushkin, D., Somasundaram, S. G., Kirkland, C. E., Bachurin, S. O., & Aliev, G. (2020). Alterations of Astrocytes in the Context of Schizophrenic Dementia. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1612.
85. Thomas, S. R., & Stocker, R. (1999). Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 4(5), 199–220.
86. Tsai, G. Y., Cui, J. Z., Syed, H., Xia, Z., Ozerdem, U., McNeill, J. H., & Matsubara, J. A. (2009). Effect of N-acetylcysteine on the early expression of inflammatory markers in the retina and plasma of diabetic rats. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 37(2), 223–231.
87. Turski, W. A., Gramsbergen, J. B. P., Traitler, H., & Schwarcz, R. (1989). Rat Brain Slices Produce and Liberate Kynurenic Acid upon Exposure to L-Kynurenine. *Journal of Neurochemistry*, 52(5), 1629–1636.
88. Uwai, Y., Honjo, H., & Iwamoto, K. (2012). Interaction and transport of kynurenic acid via human organic transporters hOAT1 and hOAT3. *Pharmacological research*, 65(2), 254–260.
89. Vamos, E., Pardutz, A., Klivenyi, P., Toldi, J., & Vecsei, L. (2009). The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *Journal of the Neurological Sciences*, 283(1–2), 21–27.
90. Varnier, G., Fedele, E., Marchi, M., & Raiteri, M. (1999). Intracerebral administration of L-kynurenine decreases N-methyl-D-aspartate receptor-mediated production of cGMP in the cerebellum and hippocampus of unanaesthetized rats subjected to transcerebral microdialysis. *Neuroscience Letters*, 266(2), 81–84.
91. Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., & Toldi, J. (2013). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(1), 64–82.

92. Viu, E., Zapata, a, Capdevila, J. L., Fossom, L. H., Skolnick, P., & Trullas, R. (1998). Glycine site antagonists and partial agonists inhibit N-methyl-D- aspartate receptor-mediated [3H]arachidonic acid release in cerebellargranule cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2), 527–532.
93. Vunck, S., Valentini, V., Arias, H., Schwarcz, R., & Bruno, J. P. (2020). Activation of alpha7 nicotinic and NMDA receptors is necessary for performance in a working memory task. *Psychopharmacology*, 237(6), 1723- 1735.
94. Watzlawik, J. O., Wootla, B., & Rodriguez, M. (2016). Tryptophan Catabolites and Their Impact on Multiple Sclerosis Progression. *Current Pharmaceutical Design*, 22(8), 1049–1059.
95. Wonodi, I., Stine, O. C., Sathyaikumar, K. V., Roberts, R. C., Mitchell, B.D., Hong, L. E., Schwarcz, R. (2011). Downregulated kynurenine 3- monooxygenase gene expression and enzyme activity in schizophrenia and genetic association with schizophrenia endophenotypes. *Archives of General Psychiatry*, 68(7), 665–674.
96. Wu, H. Q., Rassoulpour, A., & Schwarcz, R. (2007). Kynurenic acid leads, dopamine follows: A new case of volume transmission in the brain? *Journal of Neural Transmission*, 114(1), 33-41.
97. Wu, Hui Qiu, Pereira, E. F. R., Bruno, J. P., Pellicciari, R., Albuquerque, E.X., & Schwarcz, R. (2010). The astrocyte-derived $\alpha 7$ nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(1-2), 204-210.
98. Zádori, D., Klivényi, P., Plangár, I., Toldi, J., & Vécsei, L. (2011). Endogenous neuroprotection in chronic neurodegenerative disorders: With particular regard to the kynurenines. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(4), 701–717.
99. Zinger, A., Barcia, C., Herrero, M. T., & Guillemin, G. J. (2011). The involvement of neuroinflammation and kynurenine pathway in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2011, 716859.

100. Zmarowski, A., Wu, H. Q., Brooks, J. M., Potter, M. C., Pellicciari, R., Schwarcz, R., & Bruno, J. P. (2009). Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release. *European Journal of Neuroscience*, 29(3), 529–538.
101. Zsizsik, B. K., & Hardeland, R. (2002). Formation of kynurenic and xanthurenic acids from kynurenine and 3-hydroxykynurenine in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*: Role of a novel, oxidative pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 133(3), 383–392.

Subchronic *N*-acetylcysteine Treatment Decreases Brain Kynurenic Acid Levels and Improves Cognitive Performance in Mice

by  Tonali Blanco Ayala^{1,2,3}  Daniela Ramírez Ortega³  Paulina Ovalle Rodríguez³  Benjamín Pineda⁴  Gonzalo Pérez de la Cruz⁵  Dinora González Esquivel³  Robert Schwarcz⁶  Korrapati V. Sathyasaikumar⁶  Anabel Jiménez Anguiano² and  Verónica Pérez de la Cruz^{3,*} 

¹ Graduate Program in Experimental Biology, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

² Neurosciences Area, Biology of the Reproduction Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, Mexico

³ Neurochemistry and Behavior Laboratory, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", Mexico City 14269, Mexico

⁴ Neuroimmunology Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", Mexico City 14269, Mexico

⁵ Department of Mathematics, Faculty of Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico City 04510, Mexico

⁶ Maryland Psychiatric Research Center, Department of Psychiatry, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21228, USA

* Author to whom correspondence should be addressed.

Antioxidants **2021**, *10*(2), 147; <https://doi.org/10.3390/antiox10020147>

Received: 8 December 2020 / Revised: 6 January 2021 / Accepted: 16 January 2021 / Published: 20 January 2021

(This article belongs to the Special Issue Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders)

[View Full-Text](#)

[Download PDF](#)

[Browse Figures](#)

[Citation Export](#)

Abstract

The tryptophan (Trp) metabolite kynurenic acid (KYNA) is an α 7-nicotinic and *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist. Elevated brain KYNA levels are commonly seen in psychiatric disorders and neurodegenerative diseases and may be related to cognitive impairments. Recently, we showed that *N*-acetylcysteine (NAC) inhibits kynurenine aminotransferase II (KAT II), KYNA's key biosynthetic enzyme, and reduces KYNA neosynthesis in rats *in vivo*. In this study, we examined if repeated systemic administration of NAC influences brain KYNA and cognitive performance in mice. Animals received NAC (100 mg/kg, *i.p.*) daily for 7 days. Redox markers, KYNA levels, and KAT II activity were determined in the brain. We also assessed the effect of repeated NAC treatment on Trp catabolism using brain tissue slices *ex vivo*. Finally, learning and memory was evaluated with and without an acute challenge with KYNA's bioprecursor L-kynurenine (Kyn; 100 mg/kg). Subchronic NAC administration protected against an acute pro-oxidant challenge, decreased KYNA levels, and lowered KAT II activity and improved memory both under basal conditions and after acute Kyn treatment. In tissue slices from these mice, KYNA neosynthesis from Trp or Kyn was reduced. Together, our data indicate that prolonged treatment with NAC may enhance memory at least in part by reducing brain KYNA levels. [View Full-Text](#)

Keywords: *N*-acetylcysteine; kynurenic acid; kynurenine; learning and memory



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00138

Matrícula: 2173801611

El papel del sistema antioxidante glutatión sobre la producción de ácido kinurénico (KYNA) en el Sistema Nervioso Central



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 8:30 horas del día 17 del mes de febrero del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ROXANA URI MIRANDA
LABRADR. BENJAMIN
PINEDA OLVERA DR. PAUL
CARRILLO MORA
DRA. DINORA FABIOLA GONZALEZ ESQUIVEL

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

DOCTORA EN BIOLOGIA
EXPERIMENTALDE: TONALI BLANCO
AYALA

TONALI BLANCO AYALA
ALUMNA

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

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada 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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

DR. BENJAMIN PINEDA OLVERA

VOCAL

DR. PAUL CARRILLO MORA

SECRETARIA

DRA. DINORA FABIOLA GONZALEZ
ESQUIVEL