



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO PROTECTOR DE LA APOCININA EN EL  
MODELO CON ÁCIDO QUINOLÍNICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**SILVIA CRUZ ÁLVAREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE</b>	Profesor: Dr. José Pedraza Chaverrí
<b>VOCAL</b>	Profesor: Dra. Perla Carolina Castañeda López
<b>SECRETARIO</b>	Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
<b>1er. SUPLENTE</b>	Profesor: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
<b>2° SUPLENTE</b>	Profesor: Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

**ASESOR DEL TEMA**

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**SUSTENTANTE**

Silvia Cruz Álvarez

No hay discurso del método, hermano, todos los mapas mienten salvo el del corazón.

*Julio Cortázar*

### ***Mis padres***

Por el inmenso amor que me brindan, sus consejos, enseñanzas, el apoyo que han conferido a mi formación para la vida, los esfuerzos de cada día para la realización de mis metas, por la confianza que depositan en mí, por ser el mejor equipo que conozco y que ha sabido enseñarme a amar y valorar la vida, en fin, por ser parte fundamental en mi vida. ¡Gracias!

*Silvia:* soy en realidad afortunada al tener una madre como tú, eres la persona más influyente en mi vida, tu apoyo incondicional me ha permitido realizar mis sueños, no tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy contigo, una de las cosas que quisiera mencionar es que desde que recuerdo me has permitido tomar mis decisiones, y las has apoyado, confieso mamá que es lo más satisfactorio y a la vez lo más difícil que puede existir, pues con ello me has enseñado a tomar responsabilidad de mi persona, porque mis logros sin ti no existirían.

*Felipe:* toda mi vida has sido un ejemplo a seguir, eres una persona extremadamente valiosa y digna de ser admirada. He vivido junto a ti toda mi vida y cada día tu fortaleza me sorprende. Porque aunque muy a tu manera me has demostrado tu cariño, porque siempre he sentido tu protección, por enseñarme el valor de la familia e infundir en mí el sentimiento de superación. Estoy infinitamente agradecida a la vida de que seas mi papá.

### ***Mis hermanos***

*Angélica:* he ganado muchísima confianza estando contigo. Disfruto tanto de nuestras conversaciones, porque en incontables ocasiones me haces notar el sinfín de posibilidades para vivir. Eres tan inteligente y divertida que me siento muy orgullosa de ser tu hermana.

*Itahí:* admiro tu dedicación, paciencia y esfuerzos. Hay algo en tu forma de ser que me alienta en momentos complicados. Muchas veces quisiera que me contagiaras tu fortaleza, gracias por escucharme y contagiarme a soñar.

*Leonardo:* mi hermano mayor, cuando niños ¿sabes? siempre quise ser como tú, y crecí con el asombro que me causaban tus hazañas, algunas de las cuales fueron mis motivaciones para dar el siguiente paso.

### ***Mis abuelos***

Por el cariño, confianza y el apoyo brindado desde siempre. Porque sus visitas que me alegraron y aminoraron mis días sin compañía.

*Lazara:* estoy segura que tus continuas oraciones me han servido en situaciones difíciles.

*José Dolores:* por enseñarme a ser paciente y superar las equivocaciones cometidas.

## **Gracias a:**

La UNAM (a todos y cada una de las personas que hacen posible su existencia) en especial a la facultad de Química, que ya es parte de mí, por la formación académica que me brindó y las experiencias que aquí viví, que forjaron mi carácter y mi visualización del mundo.

Rosa, Paloma, Evelyn y Cynthia, por la amistad brindada y entender mis ausencias, por seguir aquí luego de tanto tiempo.

Diego, por confiar en mí, por alentarme, por los ratos en los que dejaste lo que tenías que hacer y compartiste tu tiempo conmigo ya fuera para asuntos académicos o personales, por compartir conmigo tus ideas y aprendizajes.

Julio, por ser la compañía más constante en toda la carrera, por las largas conversaciones, porque muchas de tus ideas y motivaciones me alentaron en los momentos de presión y desánimo. Vaquero te quiero mucho.

Marco, por ser el amigo más ameno a partir de toxicología, te convertiste en la persona que frecuentemente me hizo sonreír, he aprendido muchas cosas en el tiempo que hemos compartido, gracias por colorear los ratos que pase en la facultad.

Servando, por acompañarme aún a pesar de todas las incompatibilidades que tuvimos (que por cierto, siempre me ocasionaron una sonrisa) y a partir de ellas aprendí la singularidad del trato personal.

Adrián, Yari, Lidia, Oscar (Oz), Isaac, Narda, Adrián De Santiago, Paulina, Karina (Pelirroja), Marco Antonio, Oscar (Lucio), Susana (Yumi); por los favores realizados, por alegrarme en algún momento, por levantar mis ánimos, por hacerme sonreír, darme un consejo, en fin, por compartir su tiempo conmigo.

Perla por su dirección, paciencia, tiempo y hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

Mis compañeros de laboratorio: Pablo, Ricardo, Ana, Liliana, Emmanuel, Daniel, por ser un auténtico equipo de trabajo, por escucharme, aconsejarme, animarme y ayudarme.

Dra Sonia, ya que al compartir secretos se inicia una amistad.

La doctoras Diana B. y Juanita V. por su colaboración en la realización del proyecto.

Los doctores José Pedraza Chaverrí y Perla Carolina Castañeda López por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Se agradece al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la sección 024 de la AAPAUNAM por la **cátedra "Jacobo Gómez Lara"** otorgada a la alumna durante el semestre 2010-1

Se agradece a la **Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad** por la **beca Probei** (Programa de Becas de Inicio a la Investigación) otorgada a la alumna durante el desarrollo de este trabajo.

# Índice

Tema	Página
Abreviaturas	1
1 Resumen	2
2. Justificación	4
3. Marco teórico	5
3.1 Enfermedad de Huntington (EH)	5
3.1.1 Manifestaciones clínicas	5
3.1.2 Genética	6
3.1.3 Huntingtina (htt)	6
3.1.4 Neuropatología	8
3.1.5 Excitotoxicidad en la EH	9
3.1.6 Estrés oxidante en la EH	10
3.1.7 Ácido quinolínico (QUIN)	12
3.2 Glutati3n (GSH)	15
3.2.1 Funciones del GSH	16
3.2.2 Síntesis del GSH	17
3.3 Apocinina (APO)	19
4. Hip3tesis	23
5. Objetivos	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. Materiales y métodos	25
6.1 Animales	25
6.2 Reactivos	25
6.3 Dise3no experimental	26
6.4 T3cnicas	27
6.4.1 Nivel de GSH	27
6.4.2 Homogenado	28

6.4.3 Actividad de la $\gamma$ -GCL	28
6.4.4 Actividad de la GPX	29
6.4.5 Actividad de la GST	29
6.4.6 Nivel de poli-ADP ribosa	30
6.5 Análisis estadístico	30
7. Resultados	31
7.1 Nivel de GSH	31
7.2 Actividad de la $\gamma$ -GCL	32
7.3 Actividad de la GPX	34
7.4 Actividad de la GST	36
7.5 Nivel de poli-ADP ribosa	38
8. Análisis de resultados	40
9. Conclusión	47
10. Referencias	48

## **Abreviaturas**

APO	Apocinina
CT	Control
EH	Enfermedad de Huntington
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Glu	Glutamato
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Htt	Huntingtina
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducida
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOX	NADPH oxidasa
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical anión superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PARP-1	Poli-ADP-ribosa polimerasa 1
QUIN	Ácido quinolínico
rNMDA	receptor NMDA
$\gamma$ -GCL	$\gamma$ -Glutamil-Cisteina-Ligasa

## **1. RESUMEN**

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo de carácter autosómico dominante, caracterizado por desórdenes de movimiento, pérdida de peso, deterioro cognitivo y alteraciones psiquiátricas. La enfermedad se debe a una expansión inestable del trinucleótido CAG en el gen que codifica para la huntingtina (htt), resultando en una expansión de residuos de glutamina localizados en el extremo amino terminal de la proteína. Se sugiere que la degradación neuronal se debe a una ganancia de función de la proteína alterada y a una pérdida de función de la proteína de tipo silvestre. La EH es progresiva e invariablemente fatal.

El modelo experimental con ácido quinolínico (QUIN) reproduce algunas de las características bioquímicas, conductuales y patológicas de la EH en roedores y en primates no humanos. El QUIN actúa como un agonista glutamatérgico del receptor N-metil-D-aspartato (nNMDA), cuya sobreactivación dispara una cascada de eventos (excitotoxicidad y estrés oxidante, entre otros) que resultan en la muerte celular. La excitotoxicidad induce un incremento en el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular, lo cual se ha asociado con estrés oxidante y nitrante.

La apocinina (APO) es un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX), una enzima que genera anión superóxido a partir de  $O_2$ . Recientemente, se reportó que el QUIN induce la sobreactivación de la NOX y que el tratamiento con APO previene esta sobreactivación. Además, previene las alteraciones conductuales, morfológicas y el estrés oxidante inducidos por el QUIN. A pesar de que el mecanismo primario de acción de la APO es la inhibición de la NOX, también se ha reportado que puede inducir la síntesis de glutatión (GSH); sin embargo, este mecanismo no se ha estudiado en el modelo con QUIN.

Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó el papel de la APO sobre el nivel de GSH, sobre la actividad de la enzima limitante en su

síntesis: la  $\gamma$ -glutamyl-cistein-ligasa ( $\gamma$ -GCL) y de dos enzimas involucradas en su metabolismo: la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión-S-transferasa (GST). Así mismo, se evaluó su efecto sobre la muerte neuronal en el modelo de daño estriatal inducido por el QUIN. Se utilizaron ratas macho Wistar (270-320 g), divididas en 4 grupos: 1) control (CT), 2) apocinina (APO), 3) ácido quinolínico (QUIN) y 4) QUIN+APO. La APO se administró i.p. en una dosis de 5 mg/Kg, 30 min antes y 60 min después de la administración intraestriatal de 1  $\mu$ L de QUIN (240 nmol) o solución salina. El tratamiento con APO incrementó el nivel de GSH a las 8 y 24 h y la actividad de la GPX, la GST y la  $\gamma$ -GCL a las 24 h. Además, el tratamiento con APO previno la disminución inducida por el QUIN sobre el nivel de GSH y la actividad de la GPX y la  $\gamma$ -GCL a las 8 y 24 h (grupo QUIN+APO). El tratamiento con QUIN indujo un incremento en la actividad de la GST a las 24 h. Finalmente, el tratamiento con QUIN ocasionó un aumento en los niveles de poli-ADP ribosa (7 días post-lesión), el cual se previno por el tratamiento con APO. Estos resultados sugieren que el efecto protector de la APO además de estar relacionado con la inhibición de la NOX, podría estar asociado con su capacidad para inducir un incremento en el nivel de GSH.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo autosómico dominante, progresivo y fatal causado por la expansión del triplete CAG en el gen que codifica para la proteína huntingtina. La enfermedad se caracteriza por disfunción motora progresiva, disturbios emocionales, demencia y pérdida de peso [Rubinsztein & Carmichael, 2003]. Los pacientes afectados con la EH pierden su capacidad de interactuar y comunicarse, viéndose en un cuerpo que son incapaces de mover [Gusella & McDonald, 1995a].

El impacto de la EH refleja una afección severa en el bienestar físico y psicosocial de los individuos que la padecen; en especial, en relación a la actividad laboral. Debido al deterioro funcional, la naturaleza genética y que la enfermedad es crónica, se incrementa la necesidad de cuidados multidisciplinarios, consumiendo recursos familiares, médicos y sociales [Helder *et al.*, 2001].

La EH afecta a individuos de todos los grupos étnicos a través del mundo. Su incidencia es de 3-10 sujetos afectados por cada 100,000 individuos en el occidente de Europa y Norte América [Kremer *et al.*, 1994]. En México existe el reporte de 401 familias afectadas [Alonso *et al.*, 2009].

Debido a que actualmente no se cuenta con una terapia eficaz que evite la progresión de las alteraciones conductuales y morfológicas que sufren los pacientes con la EH; es necesario efectuar estudios para encontrar terapias farmacológicas que mejoren la calidad de vida de los individuos con este padecimiento. Además, al ser la EH uno de los trastornos neurodegenerativos producidos por la expansión de tripletes [Ross *et al.*, 1999], el estudio de los mecanismos patogénicos y la búsqueda de tratamientos neuroprotectores, podrían tener implicaciones en otras enfermedades neurodegenerativas causadas por la misma alteración (expansión de tripletes).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Enfermedad de Huntington (EH)**

La EH es un desorden neurodegenerativo autosómico dominante, caracterizado por desórdenes de movimiento, pérdida de peso, deterioro cognitivo y alteraciones psiquiátricas. No existe tratamiento eficaz para la enfermedad, además es progresiva e invariablemente fatal después de 15-20 años del inicio de los primeros síntomas, los cuales comienzan frecuentemente entre los 35 y 50 años de edad, aunque pueden variar desde la primera infancia hasta la vejez [Gusella & McDonald, 1995a; Rubinsztein & Carmichael, 2003].

##### 3.1.1 Manifestaciones clínicas

Los primeros síntomas son sutiles alteraciones motoras que progresan lentamente hasta la pérdida de coordinación de movimientos voluntarios (corea), la cual puede llegar a ser tan severa que el paciente pierde su capacidad de movimiento y eventualmente su capacidad de comunicarse. En etapas avanzadas de la enfermedad es común la presencia de bradicinesia y rigidez. La muerte ocurre como consecuencia de una insuficiencia cardíaca o por neumonía por aspiración. En pacientes juveniles (cuyo inicio de la enfermedad ocurre antes de los 20 años de edad) las manifestaciones clínicas son algo diferentes, incluyen bradicinesia, temblor, rigidez, distonía y la corea puede estar ausente. En niños frecuentemente se desarrollan convulsiones epilépticas [Gil & Rego, 2008].

La afección de las capacidades cognitivas en la EH comienza con una disminución en los procesos intelectuales y con problemas en la recuperación de memorias pasadas que empeoran durante el transcurso de la enfermedad. En la última etapa de la enfermedad los pacientes presentan una profunda demencia. Dentro del síndrome psiquiátrico se

encuentra el comportamiento maniaco-depresivo y los cambios en la personalidad (irritabilidad, apatía, trastornos sexuales, entre otros) [Gil & Rego, 2008; Rubinsztein & Carmichael, 2003].

### 3.1.2 Genética

Estudios genealógicos sugieren que la EH ha existido en América por lo menos desde el siglo XIX. Aunque este desorden se había descrito por varios autores, no se diferenció de otro tipo de coreas hasta la descripción detallada por George Huntington en 1872 [Lanska, 2000]. Hasta 1993, se describió que la enfermedad se debía a una expansión inestable del trinucleótido CAG en el gen que codifica para la huntingtina (htt), localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Esta alteración resulta en una expansión de residuos de glutamina localizados en el extremo amino de la proteína [The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993]. La longitud del número de repetidos CAG es inversamente proporcional a la edad de inicio de la enfermedad. Los individuos no afectados codifican de 6 a 35 repetidos del trinucleotido CAG, mientras que 36 o más repetidos definen un alelo de la EH. Los casos juveniles se caracterizan por la expansión de más de 60 repetidos [Landles & Bates, 2004].

### 3.1.3 Huntingtina (htt)

La htt es una proteína altamente conservada [Gusella & McDonald, 1995b] y no expresa homología con ninguna proteína conocida [Gusella & McDonald, 1995a]. En su forma nativa tiene una función crítica en el desarrollo [Duyao *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995]. Se sugiere que la degeneración neuronal en la EH se debe a una combinación de ganancia de función de la htt alterada junto con una pérdida de función de la htt de tipo silvestre [Landles & Bates, 2004].

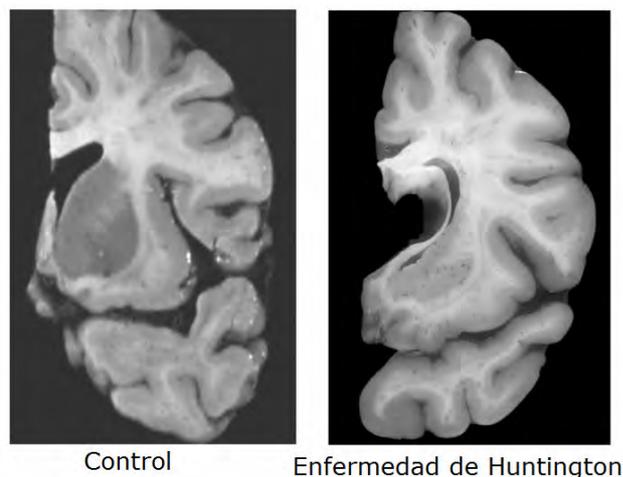
La htt se expresa a través de todo el organismo, con altos niveles en el sistema nervioso central. En la actualidad no se sabe con certeza su función endógena; sin embargo, diferentes estudios sugieren que se encuentra involucrada en distintos procesos celulares como endocitosis, transporte celular, señalización post-sináptica, mecanismos anti-apoptóticos y regulación neuronal de la expresión génica [Harjes & Wanker, 2003].

La htt alterada también tiene distribución ubicua en el organismo y no muestra distribución específica en las regiones cerebrales dañadas en el transcurso de la enfermedad [Fusco *et al.*, 1999]. El mecanismo mediante el cual la proteína alterada induce degeneración aún se desconoce; sin embargo, se ha descrito que la proteólisis de la htt alterada está involucrada en la patogénesis de la enfermedad, originando fragmentos amino-terminales anormales y tóxicos que producen agregados citosólicos y nucleares en neuronas [Paulson, 1999], y falla en la función proteosomal [Jana *et al.*, 2001]. Se han detectado complejos de alto peso molecular y cuerpos de inclusión en áreas afectadas del cuerpo estriado en la EH. De esta forma, aunque los mecanismos que inducen toxicidad no están completamente dilucidados se acepta generalmente que las alteraciones y/o el secuestro de proteínas importantes para la célula, son los posibles eventos primarios que causan la disfunción y la muerte neuronal en la EH [Trushina & McMurray, 2007].

En estriado y corteza de cerebros post-mortem de pacientes con EH se ha observado una relación directa entre la expresión de la htt alterada y el estrés oxidante, que se manifiesta a través del aumento en marcadores de daño oxidante a lípidos, proteínas y ADN [Browne & Beal, 2006].

### 3.1.4 Neuropatología

La característica patológica distintiva de la EH es la atrofia progresiva del núcleo caudado y putamen (cuerpo estriado, Esquema 1). Para clasificar la severidad de la enfermedad Vonsattel y colaboradores [1985] desarrollaron un sistema basado en criterios macro y microscópicos del patrón de degeneración estriatal de cerebros post-mortem diagnosticados con la enfermedad. Dicho sistema clasifica a la EH en cinco grados (0-4) designados en forma ascendente de severidad. El grado 0 se asigna cuando macroscópicamente los cerebros afectados parecen indistinguibles de los cerebros normales, sin embargo por ensayos histológicos puede observarse un 30-40% de pérdida neuronal en el centro del núcleo caudado. Mientras que en el grado 4 existe atrofia severa del cuerpo estriado y más del 95% de pérdida neuronal.



**Esquema 1.** Fotografía de la degeneración del cuerpo estriado en un cerebro con EH en comparación con un cerebro control [Tomado de Sorolla *et al.*, 2008].

En el estriado, la población neuronal más afectada son las neuronas espinales de proyección mediana, que corresponden al 95% de la población neuronal estriatal. Estas neuronas son en parte reguladas por entradas dopaminérgicas procedentes de la parte

compacta de la sustancia negra, y por entradas glutaminérgicas de la corteza cerebral y el tálamo, a través de una vía directa y una vía indirecta que cruzan los segmentos externos del globo pálido y el núcleo subtalámico. Las neuronas espinales de proyección mediana usan el transmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -aminobutírico y dinorfina, encefalina o sustancia P como co-transmisores [Gil & Rego, 2008].

La vulnerabilidad del estriado y la susceptibilidad de las subpoblaciones neuronales estriatales sugieren un aumento en el riesgo de excitotoxicidad mediado por el glutamato (Glu). El estriado recibe impulsos glutaminérgicos de la corteza cerebral. Las neuronas espinales más vulnerables contienen subtipos de receptores N-metil-D-aspartato (rNMDA) para el Glu, principalmente NMDAR-1 y NMDAR-2b, lo que facilita la excitotoxicidad mediada por el Glu [Browne & Beal, 2006].

### 3.1.5 Excitotoxicidad en la EH

El término excitotoxicidad hace referencia a una sobre excitación neuronal debida al principal neurotransmisor excitador, el Glu, que desencadena una serie de eventos que llevan al estrés oxidante y a la muerte celular, debido a la entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$  [Raymond, 2003].

Existen dos clases de receptores para el Glu, los receptores ionotrópicos que son canales iónicos dependientes de ligando y los receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G. Los receptores ionotrópicos de Glu se denominan según la molécula agonista que los activa: los receptores NMDA, por el N-metil-D-aspartato; los receptores de tipo AMPA, por  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato y los receptores de tipo kainato, por el ácido kaínico [Nakanishi, 1992].

Los rNMDA son receptores ionotrópicos hetero-multiméricos que median la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Se componen de dos subunidades NR1 y al menos dos subunidades NR2 (del tipo "a" al tipo

“d”). Estos receptores son coactivados por el Glu y la glicina [Fan & Raymond, 2007].

Los rNMDA tienen un papel importante en la excitotoxicidad debido a su alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , su gran conductancia de un solo canal, su lenta desensibilización y su cinética de cierre de canal [Raymond, 2003].

La excitotoxicidad mediada por los rNMDA en las neuronas espinales de proyección mediana puede deberse a varios mecanismos: 1) aumento en la liberación de Glu en la sinapsis córtico-estriatal; 2) disminución de la recaptura de Glu después de la liberación sináptica; 3) aumento en la respuesta postsináptica de los rNMDA al Glu; y 4) disminución de la capacidad de la mitocondria para amortiguar grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  y cargas de radicales libres y/o mantener los niveles de ATP [Raymond, 2003].

Los estudios que demostraron que la administración directa de análogos de Glu (ácido kaínico, ácido quinolínico) en el estriado de ratas inducen la muerte de neuronas espinales de proyección mediana, condujeron a postular el papel de la excitotoxicidad en la patogénesis de la EH [McGeer & McGeer, 1976; Schwarcz *et al.*, 1983].

La “hipótesis de excitotoxicidad” en la EH estipula que la activación excesiva de los receptores para el Glu desencadena una serie de eventos como alteración intracelular en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , alteración mitocondrial, entre otros, que dan lugar a la disfunción y la muerte de neuronas espinales de proyección mediana [Fan & Raymond, 2007].

### 3.1.6 Estrés oxidante en la EH

El término especies reactivas de oxígeno (ERO) es utilizado para describir una variedad de moléculas y radicales libres derivados del  $\text{O}_2$ , que a diferencia de éste en su forma molecular (muy poco reactivo), son

más propensas a participar en reacciones químicas. Las principales ERO son: 1) el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que tiene propiedades tanto oxidantes como reductoras y que puede reaccionar principalmente con iones metálicos; 2) el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), es un oxidante débil que ataca principalmente tioles; 3) la reacción entre el  $O_2^{\bullet-}$  y el óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) produce peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un fuerte agente oxidante y nitrante; 4) la reacción del  $H_2O_2$  con el ión cloruro catalizada por mieloperoxidasa produce hipoclorito, un compuesto oxidante y clorante; 5) la reacción del  $H_2O_2$  con iones metálicos de transición produce radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), la especie más reactiva encontrada *in vivo*. El  $OH^{\bullet}$  reacciona rápida e indiscriminadamente con toda clase de biomoléculas: ácidos nucleicos, nucleótidos libres, proteínas, lípidos y carbohidratos [Bartosz, 2009]. Por otro lado, los oxidantes derivados del  $NO^{\bullet}$ , se denominan especies reactivas de nitrógeno (ERN) [Bedard & Krause, 2007].

El estrés oxidante es el desequilibrio a favor de los procesos bioquímicos que conducen a la generación de ERO/ERN y la disminución de los sistemas responsables de removerlos [Sayre *et al.*, 2008; Mariani *et al.*, 2005]. Además, el sistema nervioso central es particularmente susceptible al daño oxidante debido a: 1) la concentración relativamente baja de las defensas antioxidantes, 2) la alta concentración de lípidos poli-insaturados, 3) el elevado consumo de oxígeno y 4) las regiones con altas concentraciones de metales de transición capaces de favorecer catalíticamente la formación de ERO [Sayre *et al.*, 2008].

En la célula, la mitocondria es la principal fuente de ERO debido al transporte de electrones en la fosforilación oxidativa [Turrens, 2003]. Con la finalidad de proteger a la célula de las ERO/ERN, la membrana mitocondrial interna incorpora moléculas recolectoras de radicales libres como la vitamina E, el ascorbato y el glutatión (GSH). Además, existe

remoción de radicales libres por enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, etc [Trushina & McMurray, 2007].

Se ha visto en personas que padecen la EH y en modelos de la enfermedad, que las mitocondrias se encuentran disfuncionales. La htt alterada afecta la motilidad mitocondrial, aunque no es claro si la inmovilización de la mitocondria conduce a su disfunción. Se sugiere que la disfunción mitocondrial induce un aumento en la producción de radicales libres, lo que podría iniciar el daño oxidante. Desafortunadamente, debido a los múltiples efectos de la htt alterada no es posible resolver la cuestión de si el daño mitocondrial es un evento primario o secundario en la toxicidad [Trushina & McMurray, 2007].

Las ERO reaccionan con una gran variedad de moléculas para iniciar la muerte neuronal y por lo tanto la neurodegeneración a través de diferentes vías. El estrés oxidante tiene como consecuencia el deterioro de las funciones celulares y la formación de especies tóxicas, como peróxidos, alcoholes, aldehídos, cetonas y colesterol oxidado [Barnham *et al.*, 2004].

Se ha reportado un incremento en el nivel de marcadores de daño oxidante en el cerebro de pacientes post-mortem con la EH [Stoy *et al.*, 2005].

### 3.1.7 Ácido quinolínico (QUIN)

El QUIN (ácido 2,3-piridin dicarboxílico, esquema 2), es un compuesto que se encuentra normalmente en el cerebro humano y en el de la rata [Wolfensberger *et al.*, 1983].

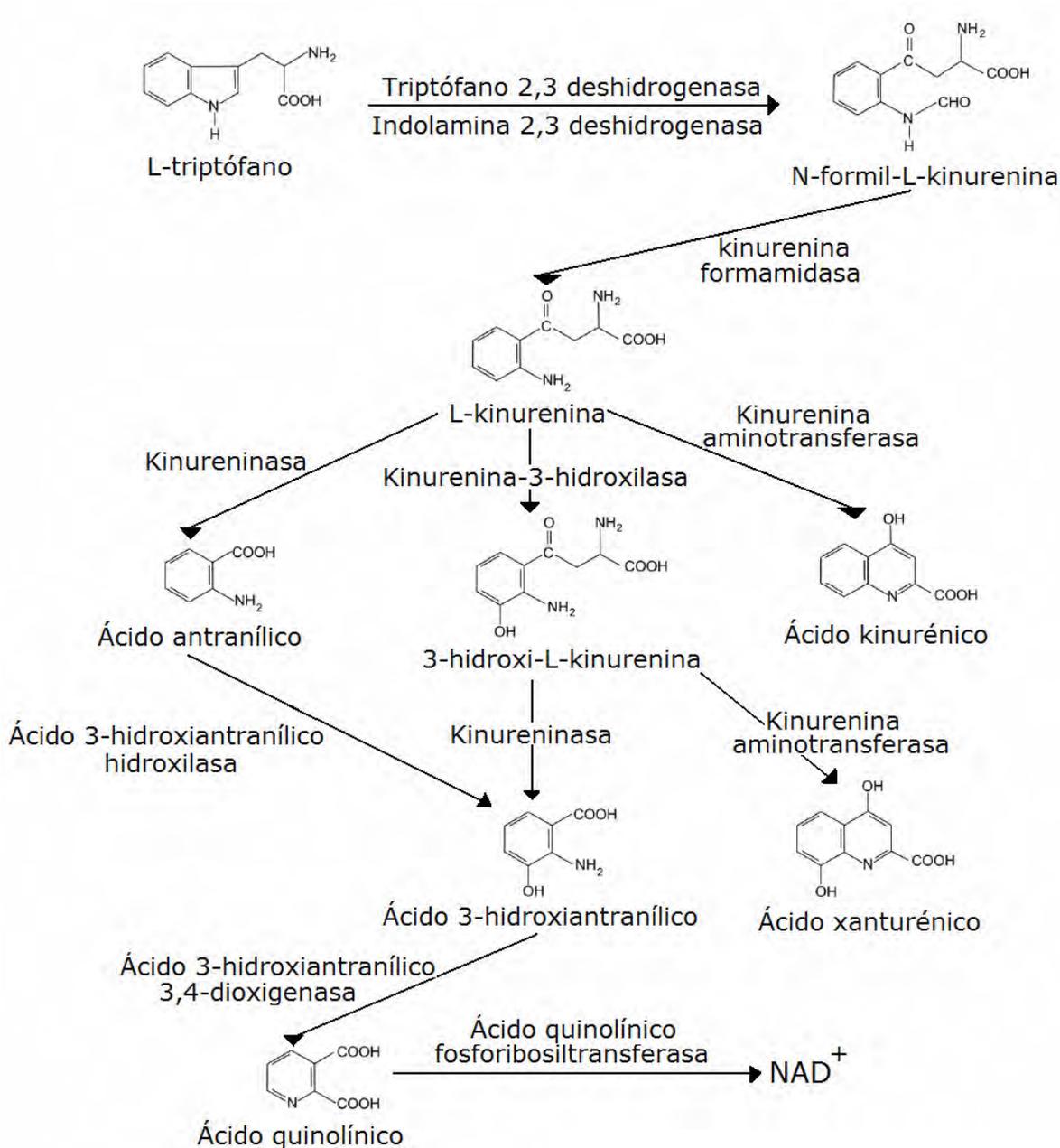


**Esquema 2.** Estructura química del ácido quinolínico

La administración intraestriatal de QUIN reproduce algunas características bioquímicas, conductuales y patológicas de la EH en roedores y primates no humanos [Schwarcz *et al.*, 1983].

El QUIN actúa como un agonista glutamatérgico sobre la subunidad NR2b del rNMDA, cuya sobreactivación dispara una cascada de eventos (excitotoxicidad, estrés oxidante, entre otros) que resultan en la muerte celular [Pérez-Severiano *et al.*, 2004; Santamaría *et al.*, 2001; Schwarcz, 2004; Stone, 1993; Chiarugi *et al.*, 2001]. La excitotoxicidad induce un incremento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo cual se ha asociado con la generación de estrés oxidante y nitrante, ya que se induce la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$  por la activación de la sintasa de  $\text{NO}^{\bullet}$  [Chiarugi *et al.*, 2001; Aguilera *et al.*, 2007]. Además, el QUIN puede formar complejos con el Fe(II) y generar  $\text{OH}^{\bullet}$  en el estriado [Santamaría *et al.*, 2001].

El QUIN es un metabolito de la vía de la Kinurenina (Esquema 3). Esta vía es la ruta central del metabolismo del triptófano en la mayoría de los tejidos de mamíferos, incluyendo el cerebro. Además es la principal vía responsable de la formación de nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y NAD fosfato ( $\text{NADP}^+$ ) [Vamos *et al.*, 2009]. El compuesto primordial en esta vía es la L-kinurenina que se puede metabolizar a través de dos rutas diferentes a ácido kinurénico o a 3-hidroxi-L-kinurenina y QUIN, metabolitos conocidos como kinureninos neuroactivos. El ácido kinurénico se forma a partir de la L-kinurenina por una transaminación irreversible catalizada por la kinurenina aminotrasferasa. El QUIN y la 3-hidroxi-L-kinurenina, se forman por las enzimas 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa y kinurenina 3-hidroxilasa, respectivamente [Zádori *et al.*, 2009].



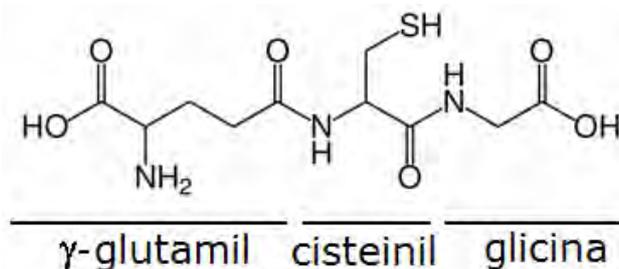
**Esquema 3.** Vía de la Kinurenina: ruta principal del metabolismo del triptófano [Modificado de Vamos *et al*, 2009].

La presencia de kinureninos neuroactivos, de las enzimas de la vía de la kinurenina en el cerebro de mamíferos; así como el descubrimiento de mecanismos complejos, en algunos casos cerebro-específicos, que regulan la formación y disposición de metabolitos en esta vía, apoyan su posible función en la fisiología cerebral [Schwarcz, 2004].

El metabolismo de la vía de la kinurenina se afecta en una gran variedad de enfermedades humanas; en la EH el QUIN se encuentra incrementado en el estriado y en la corteza cerebral en etapas tempranas del padecimiento [Schwarcz, 2004]. Se ha propuesto que el QUIN a través de la estimulación excesiva de los rNMDA y la producción de ERO tiene un papel causal en la patología de la EH [Schwarcz *et al.*, 2010].

### 3.2 Glutación (GSH)

El tripéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cistein-glicina conocido como GSH (Esquema 4), es el tiol más abundante en las células de mamíferos. El grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína está involucrado en reacciones de conjugación y reducción, que generalmente se consideran las funciones más importantes de la molécula [Franco & Cidlowski, 2009; Forman *et al.*, 2009]. El GSH se puede encontrar como tiol-reducido (GSH) o como disulfuro oxidado (GSSG). La forma predominante y biológicamente activa es el GSH, que existe en concentraciones milimolares en la mayoría de las células. El contenido de GSSG es menor del 1% de la cantidad de GSH. Aproximadamente el 90% del GSH celular se encuentra en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático. En mamíferos se encuentra en todos los tejidos, pero es muy abundante en el hígado [Sies, 1999; Lu, 2009].

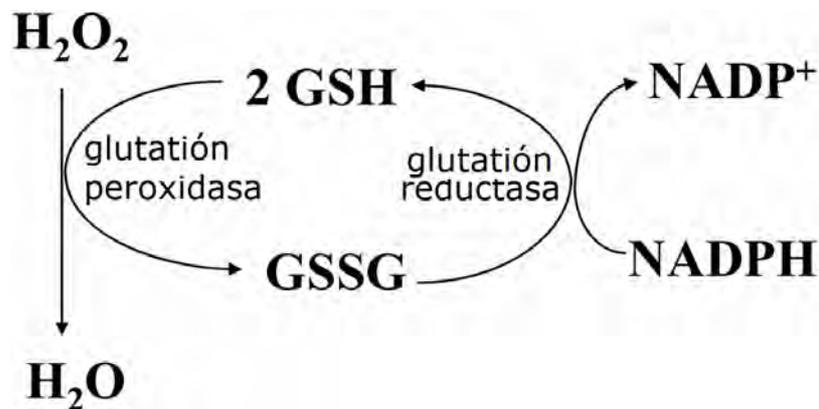


**Esquema 4.** Estructura química del GSH.

### 3.2.1 Funciones del GSH

El GSH participa en varias funciones celulares:

- Es el principal antioxidante celular no enzimático, ya que actúa como agente reductor que mantiene un estricto control del estado redox de la célula [Franco & Cidlowski, 2009]. El GSH se utiliza en reacciones enzimáticas para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , producto de la respiración mitocondrial; en dichas reacciones, el GSH es oxidado a GSSG por medio de la glutatión peroxidasa (GPX) dependiente de selenio. El GSSG es potencialmente tóxico para las células, por lo que existe una alta actividad de la glutatión reductasa dependiente de NADPH que se encarga de reducir el GSSG a GSH, formando un ciclo redox (Esquema 5). El GSH también se utiliza de forma no enzimática para mantener al ascorbato y al  $\alpha$ -tocoferol en sus formas reducidas y funcionales [Lu, 2009; Jones, 2002; Forman, 2009].

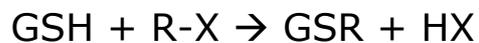


**Esquema 5.** Ciclo entre GSH y GSSG.

Bajo condiciones normales, las células mantienen un nivel basal del par GSH/GSSG que determina la capacidad antioxidante de las células [Jones, 2002].

- Otra función primordial del GSH es la detoxificación de xenobióticos y/o sus metabolitos, así como compuestos endógenos como lípidos peroxidados. Dichos compuestos son electrófilos y forman conjugados con el GSH espontánea o enzimáticamente [Lu, 2009].

La mayor parte de las reacciones con substratos electrofílicos (R-X) son catalizadas por una extensa familia de enzimas conocidas como GSH-S-transferasas (GST). Las GST catalizan la siguiente reacción general [Armstrong, 1997]:



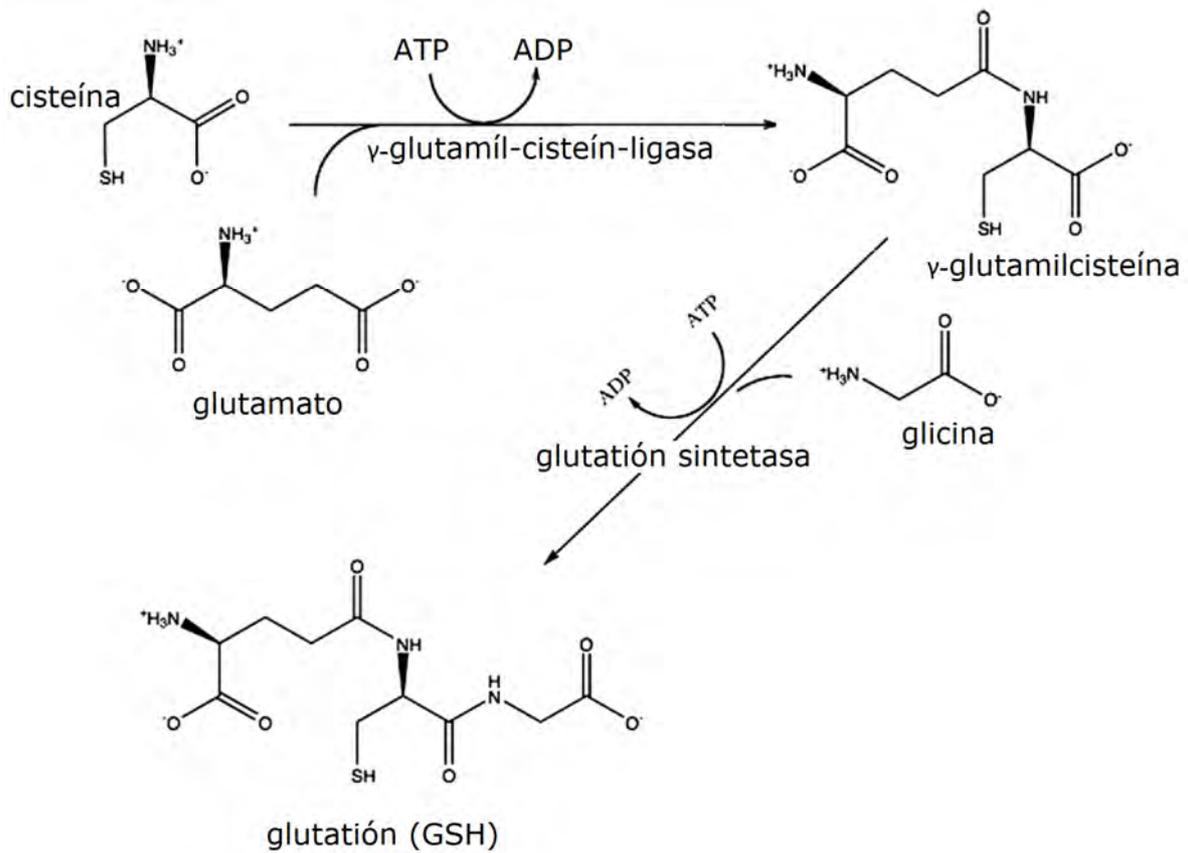
- El GSH también está involucrado en otras funciones vitales que incluyen: a) mantenimiento del estatus tiol esencial de la proteínas; b) es un reservorio de cisteína; y c) está implicado en la modulación de procesos celulares críticos como la síntesis de ADN, procesos microtubulares y la función inmune [Lu, 2009].

### 3.2.2 Síntesis de GSH

En células de mamíferos, existen tres mecanismos que se encargan de mantener la homeostasis del GSH: la síntesis de *novo*, la captura de fuentes exógenas a través de la membrana plasmática y la reducción del GSSG catalizada por la glutatión reductasa [Circu & Aw, 2008].

La síntesis de *novo* del GSH ocurre exclusivamente en el citosol [Circu & Aw, 2008] y comienza con la unión de la cisteína y el Glu para producir  $\gamma$ -glutamyl-cisteína, por la acción de la  $\gamma$ -glutamyl-cistein-ligasa ( $\gamma$ -GCL; también llamada  $\gamma$ -glutamyl-cisteín-sintetasa). Este proceso requiere la hidrólisis de ATP para formar el enlace amida entre el grupo  $\gamma$ -carboxilo del Glu y el grupo amino de la cisteína. El segundo paso

involucra a la glutatión sintetasa que se encarga de la adición de la glicina al dipéptido para producir el GSH, este paso también requiere la hidrólisis de ATP (Esquema 6) [Forman *et al.*, 2009].



**Esquema 6.** Síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos correspondientes, se realiza en dos reacciones dependientes de ATP por la acción secuencial de la  $\gamma$ -GCL y GSH sintetasa [Forman *et al.*, 2009].

En condiciones normales la velocidad de síntesis del GSH está determinada por dos factores: la disponibilidad de cisteína y la actividad de la  $\gamma$ -GCL [Lu, 2009].

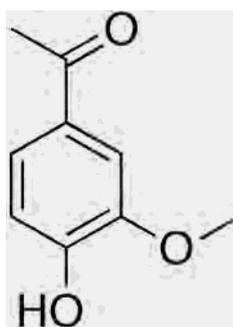
La  $\gamma$ -GCL de mamíferos es un heterodímero conformado por una subunidad pesada catalíticamente activa (76 kDa), que es inhibida por

retroalimentación por el GSH; y una subunidad ligera (26 kDa) que tiene una función reguladora [Huang *et al.*, 1993].

La  $\gamma$ -GCL se regula tanto a nivel de su actividad enzimática, como a nivel de la expresión de sus dos subunidades. Las especies oxidantes y los electrófilos pueden incrementar la transcripción de ambas subunidades [Lu, 2009; Forman *et al.*, 2009]. El uso de quinonas incrementa la cantidad de GSH en las células debido a que incrementa la transcripción de la subunidad catalítica de la  $\gamma$ -GCL [Shi *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002].

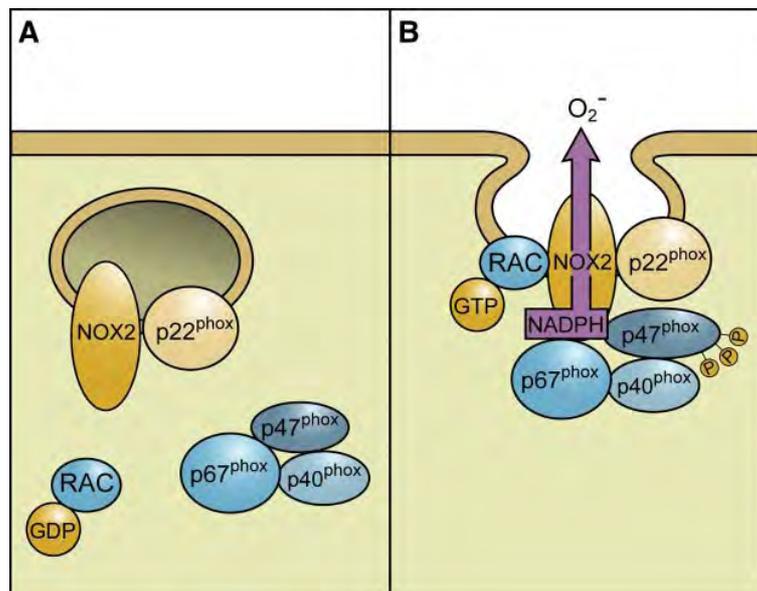
### 3.3 Apocinina (APO)

La APO (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, Esquema 7) o acetovanillona es una acetofenona de ligero olor a vainilla, con un peso molecular de 166,17 g/mol. La APO se aisló por primera vez de la raíz de *Apocynum cannabinum*; aunque también es un componente del extracto de la raíz de la planta medicinal *Picrorhiza kurroa*, esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional oriental para una diversidad de condiciones [Stefanska & Pawliczak, 2008].



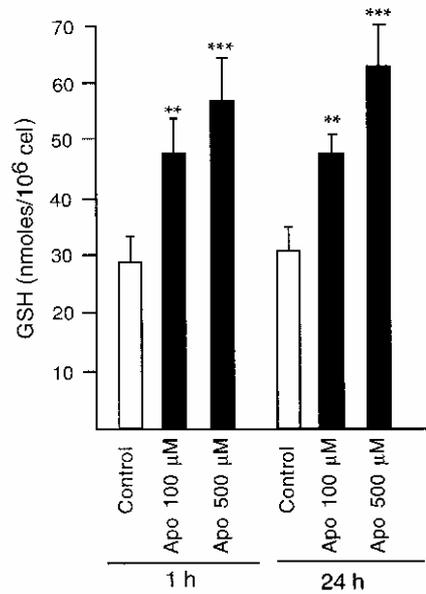
**Esquema 7.** Estructura química de la apocinina.

El principal mecanismo de acción de la APO se ha asociado con la inhibición de la NADPH oxidasa (NOX) [Simons *et al.*, 1990]. La APO inhibe la producción del  $O_2^{\bullet-}$  generado por neutrofilos y eosinofilos activados, debido a que interfiere con el ensamblaje de la NOX (Esquema 8), impidiendo la translocación intracelular de los componentes citosolicos,  $p47^{phox}$  y  $p67^{phox}$ , necesarios para la actividad de la enzima [Stolk *et al.*, 1994].



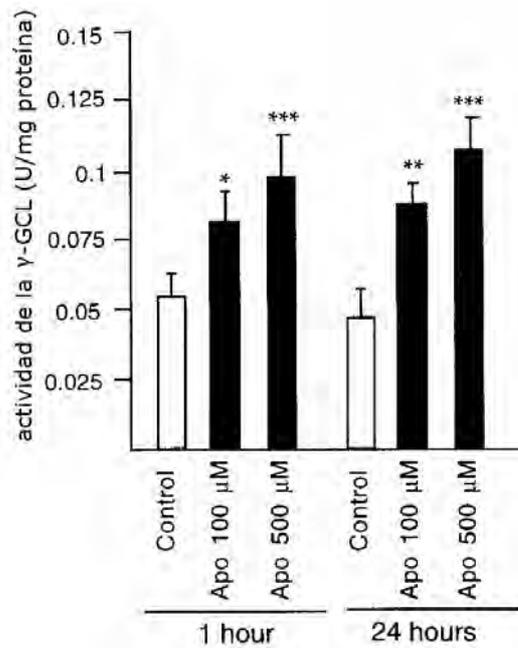
**Esquema 8.** Esquemización del ensamblaje de la NOX fagocítica. En neutrófilos en reposo, NOX2 y  $p22^{phox}$  se encuentran fuertemente asociados para estabilizarse uno a otro, en la membrana de vesículas intracelulares (A). Al activarse, se produce un intercambio de GDP a GTP en Rac que activa dicha subunidad. La fosforilación de la subunidad citosólica  $p47^{phox}$  produce cambios conformacionales que permiten la interacción con  $p22^{phox}$ . El movimiento de  $p47^{phox}$  atrae a  $p67^{phox}$  y  $p40^{phox}$ , para formar el complejo activo (B). El complejo activo transporta electrones del NADPH en el citoplasma al  $O_2$  extracelular para generar  $O_2^{\bullet-}$  [Tomado de Bedard & Krause, 2007].

Sin embargo, se han propuesto otros mecanismos de acción para esta molécula, uno de ellos propone que la APO incrementa los niveles intracelulares de GSH. Se ha observado en células epiteliales de pulmón que el tratamiento con APO incrementa el nivel de GSH desde 1 y hasta 24 h de tratamiento (Esquema 9).

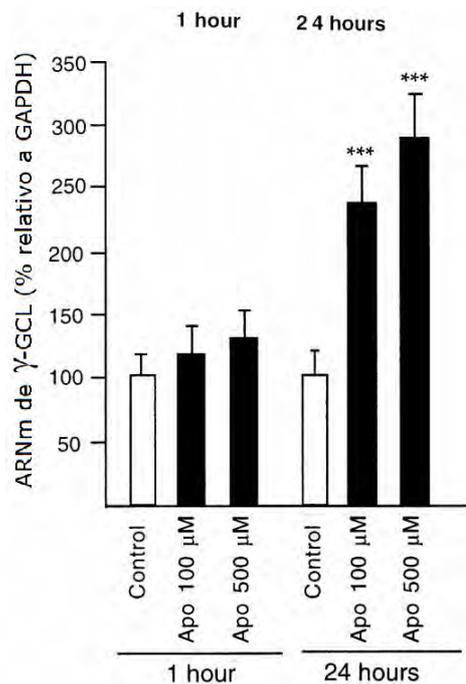


**Esquema 9.** Efecto de la APO sobre el nivel de GSH en células epiteliales de pulmón. Las células se expusieron a 100 y 500 μM de APO durante 1 y 24 h. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs control [Tomado de Lapperre *et al.*, 1999].

En este mismo estudio, se encontró que el incremento en el nivel de GSH se debía a un aumento en la actividad (Esquema 10) y en la expresión de la  $\gamma$ -GCL (Esquema 11), la enzima limitante en la síntesis de este antioxidante intracelular [Lapperre *et al.*, 1999].



**Esquema 10.** Efecto de la APO sobre la actividad de la  $\gamma$ -GCL en células epiteliales de pulmón. Las células se expusieron a 100 y 500  $\mu$ M de APO durante 1 y 24 h. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control [Tomado de Lapperre *et al.*, 1999].



**Esquema 11.** Efecto de la APO sobre la expresión de ARNm de la  $\gamma$ -GCL en células epiteliales de pulmón. Se aisló el ARN total de las células control y de las células expuestas a 100 y 500  $\mu$ M de APO durante 1 y 24 h. La gráfica representa la estimación numérica del nivel de ARNm de  $\gamma$ -GCL comparado con el mRNA de la GAPDH. \*\*\* $P < 0.001$  vs control [Tomado de Lapperre *et al.*, 1999].

#### **4. HIPOTÉISIS**

- Si la APO además de inhibir a la NOX, actúa regulando positivamente la síntesis de GSH entonces los niveles de este antioxidante celular aumentarán y el daño neuronal disminuirá tras la administración de QUIN.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

En el modelo de neurotoxicidad por QUIN, evaluar si la APO ejerce su efecto protector a través de un mecanismo independiente de la inhibición de la NOX.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Evaluar si la APO ejerce su efecto protector a través de un mecanismo asociado con el incremento del nivel de GSH, cuantificando los niveles de este antioxidante a las 8 y 24 h post-lesión con QUIN.
- Evaluar el efecto de la APO sobre la actividad de la  $\gamma$ -GCL, enzima limitante en la síntesis de GSH, a las 8 y 24 h post-lesión con QUIN.
- Evaluar el efecto de la APO sobre la actividad de las enzimas GPX y GST, ambas relacionadas con el metabolismo del GSH, a las 8 y 24 h post-lesión con QUIN.
- Evaluar si la APO disminuye la muerte neuronal mediante la cuantificación de los niveles de poli-ADP ribosa, un marcador de muerte por necrosis, a los 7 días post-lesión con QUIN.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Animales**

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso de 270 a 320 g, criadas en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía bajo condiciones controladas de iluminación (ciclos de 12 h de luz y oscuridad), temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) y humedad ( $50\% \pm 10\%$ ). Se les suministró alimento comercial para rata (Laboratory rodent diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (5 ratas por caja). Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y a los parámetros locales sobre el Uso Ético de Animales por el Ministerio de Salud de México. Durante todos los experimentos se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

### **6.2 Reactivos**

El ácido quinolínico (QUIN), la apocinina (APO), el folín, el o-ftaldehído, la NADPH, la GSH reductasa, el ácido glutámico, el ácido 5-sulfosalicílico, el inhibidor de proteasa (Protease inhibitor cocktail for Mammalian tissues, Sigma P8340) y la albúmina de suero bovino; se adquirieron de Sigma (St Louis, MO, USA). El 2,3-naftalendicarboxialdehído (NDA), fue de Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). El anticuerpo primario anti-poli(ADP)ribosa fue de Biomol Internacional LP (Plymouth Meeting, PA, USA). El anticuerpo peroxidado anti-IgG fue de Jackson ImmunoResearch, Laboratorios, Inc (West Grove, PA, USA). Los demás reactivos se obtuvieron de casas comerciales conocidas.

### 6.3 Diseño experimental

Todos los experimentos se realizaron por la mañana (comenzando a las 7:00 h). Se trabajó con 4 grupos de animales divididos al azar como se menciona a continuación (n = 6 ratas/grupo): 1) Control (CT), ratas inyectadas intraestriatalmente e i.p. con solución salina; 2) Control con apocinina (APO), ratas inyectadas intraestriatalmente con solución salina e i.p. con APO; 3) Ácido quinolínico (QUIN), ratas inyectadas intraestriatalmente con QUIN e i.p. con solución salina; 4) Ácido quinolínico más apocinina (QUIN+APO), ratas inyectadas intraestriatalmente con QUIN e i.p. con APO.

Los animales tratados con QUIN recibieron intraestriatalmente 1  $\mu$ L equivalente a 240 nmol, previa anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/Kg, i.p.), en las siguientes coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior al bregma<sup>1</sup>, -2.6 mm lateral al bregma y -4.5 mm ventral a la dura<sup>2</sup> [Paxinos & Watson, 1998].

Los animales tratados con APO recibieron 30 min antes y 60 min después de la administración intraestriatal con QUIN o solución salina una dosis de 5 mg/Kg, i.p. Se utilizó este esquema y dosis debido a que se ha reportado que las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por el QUIN disminuyen significativamente [Maldonado *et al.*, 2010].

Un primer grupo (48 animales) se sacrificó 8 (24 animales) y 24 h (24 animales) después de la administración con QUIN o solución salina y se extrajo el cuerpo estriado para determinar el nivel de GSH. Los tiempos se escogieron para observar el comportamiento del antioxidante y determinar si la APO además de inhibir a la NOX, tiene un efecto sobre el nivel de GSH.

---

<sup>1</sup> Punto anatómico en el cráneo en el que se cruzan la sutura sagital con la sutura coronal.

<sup>2</sup> Meninge exterior que protege al encéfalo.

Un segundo grupo (48 animales) se sacrificó 8 (24 animales) y 24 h (24 horas) después de la administración con QUIN o solución salina y se extrajo el cuerpo estriado para determinar la actividad de la enzima limitante en la síntesis del GSH: la  $\gamma$ -GCL; y dos enzimas relacionadas con su metabolismo: la GPX y la GST.

Un tercer grupo (24 animales) se sacrificó 7 días después de la administración con QUIN o solución salina y se extrajo el cerebro para determinar el nivel de poli-ADP ribosa por inmunohistoquímica, un marcador de muerte neuronal por necrosis. Esto con el fin de observar si la APO tiene un efecto protector a largo plazo.

## **6.4 Técnicas**

### 6.4.1 Nivel de GSH

El nivel de GSH se determinó utilizando el método descrito por Hissin y Hilf [1976]. Las muestras del cuerpo estriado se homogenizaron en un amortiguador de fosfatos-EDTA (pH 8) con  $H_3PO_4$  25% y se centrifugaron a 3,000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:10 y se tomaron 100  $\mu$ L que se mezclaron con 100  $\mu$ L de o-ftaldehído y 1,800  $\mu$ L del amortiguador de fosfatos-EDTA (pH 8). Esta mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente, en ausencia de total de luz. La señal fluorescente se midió en un espectrofotómetro de luminiscencia, empleando una longitud de emisión y excitación de 420 nm y 350 nm, respectivamente. Se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra a partir de una curva estándar con albúmina bovina, mediante el método de cuantificación de proteínas totales de Lowry [Lowry *et al.*, 1951]. Los datos se expresan como  $\mu$ g de GSH/mg de proteína.

#### 6.4.2 Homogenado

Se prepararon homogenizados para medir la actividad enzimática de la  $\gamma$ -GCL, la GPX y la GST. Se extrajo el cuerpo estriado y se homogenizó en 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis (Tris 10 mM -pH 7.9-, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM) y 5  $\mu$ L de inhibidores de proteasas, se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta que se utilizó para realizar las mediciones.

#### 6.4.3 Actividad de la $\gamma$ -GCL

La actividad de  $\gamma$ -GCL se determinó mediante el ensayo descrito por White y colaboradores [2003]. Se mezclaron 10  $\mu$ L del sobrenadante (sección 6.4.2) con 40  $\mu$ L de amortiguador TES-SB (Tris base 20 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, L-serina 2 mM y ácido bórico 20 mM) y 50  $\mu$ L de la mezcla de reacción (Tris base 400 mM, ATP 40 mM, ácido-L-glutámico 20 mM, EDTA 2 mM, ácido bórico 20 mM, L-serina 2 mM y cloruro de magnesio hexahidratado 40 mM). La solución se precalentó a 37°C durante 20 seg. Para iniciar la reacción se adicionaron 50  $\mu$ L de L-cisteína 2 mM. La mezcla se incubó 20 min a 37°C; para detener la reacción se agregaron 50  $\mu$ L de ácido 5-sulfosalicílico 200 mM. Se adicionaron 50  $\mu$ L de L-cisteína 2 mM a cada muestra y se colocaron en hielo durante 20 min, después de lo cual se centrifugaron a 2,000 x g por 5 min a 4°C. Se tomaron 20  $\mu$ L del sobrenadante y se colocaron en una placa negra de 96 pozos. Se adicionaron a cada pozo 180  $\mu$ L de la solución 2,3-naftalendicarboxialdehído -NDA- (Tris base 50 mM, NaOH 0.5 N y NDA 10 mM disuelto en DMSO, v/v/v 1.4/0.2/0.2). La placa se incubó 30 min a temperatura ambiente, en ausencia total de luz. La fluorescencia se determinó usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm usando un lector de placas Synergy HT multi-mode microplate reader (Biotek

Instruments Inc, Winooski, VT, USA). Los resultados se expresan en nmol de GSH sintetizado por encima del GSH basal/min/mg proteína.

#### 6.4.4 Actividad de la GPX

Se determinó la actividad de la GPX, mediante el método modificado por Pedraza-Chaverrí y colaboradores [2000]. Se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante (sección 6.4.2) a los que se les adicionaron 800  $\mu$ L de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM, GSH reductasa 1 U/mL y amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7). La solución se incubó a temperatura ambiente 5 min, para comenzar la reacción se agregaron 100  $\mu$ L de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.10%. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 340 nm durante 2.5 min, cada 30 seg. La actividad se calculó por la pendiente de las líneas obtenidas Se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra a partir de una curva estándar con albúmina bovina, mediante el método de cuantificación de proteínas totales de Lowry [Lowry *et al.*, 1951]. Los datos se expresan en U/mg de proteína. Se utilizó amortiguador de fosfatos como blanco en cada ensayo.

#### 6.4.5 Actividad de la GST

Se determinó la actividad de la GST por el método descrito por Habig y colaboradores [1974]. Se tomaron 80  $\mu$ L del sobrenadante (sección 6.4.2) al que se le adicionaron 850  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 0.05 M (pH 6.5) y 20  $\mu$ L de GSH 0.1 M, para comenzar la reacción se adicionaron 50  $\mu$ L de 1,cloro-2,4,dinitrobenceno. Se midió la reacción espectrofotométricamente a 340 nm cada 30 seg durante 3 min. Se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra a partir de una curva estándar con albúmina bovina, mediante el método de cuantificación de proteínas totales de Lowry [Lowry *et al.*, 1951]. Los

datos se expresan como U/mg de proteína. Se calibró con un tubo que contenía todos los reactivos y agua en lugar de muestra.

#### 6.4.6 Nivel de poli-ADP ribosa

Siete días después de la administración de QUIN, los cerebros se extrajeron y se fijaron en formalina al 10% por 24 h. Posteriormente, se deshidrataron gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol, se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes coronales de 5  $\mu$ m de la zona de lesión. Se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4.5%. Después, las muestras se incubaron con albúmina 3%, se lavaron y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-poli(ADP)ribosa (1:200). Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo peroxidado anti-IgG (1:500) y se realizó otro lavado e incubación con diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los cortes se contrastaron con hematoxilina. Las muestras se analizaron con un sistema Zeiss KS 300, versión 3.0. Los controles se normalizaron a 1 (unidades arbitrarias).

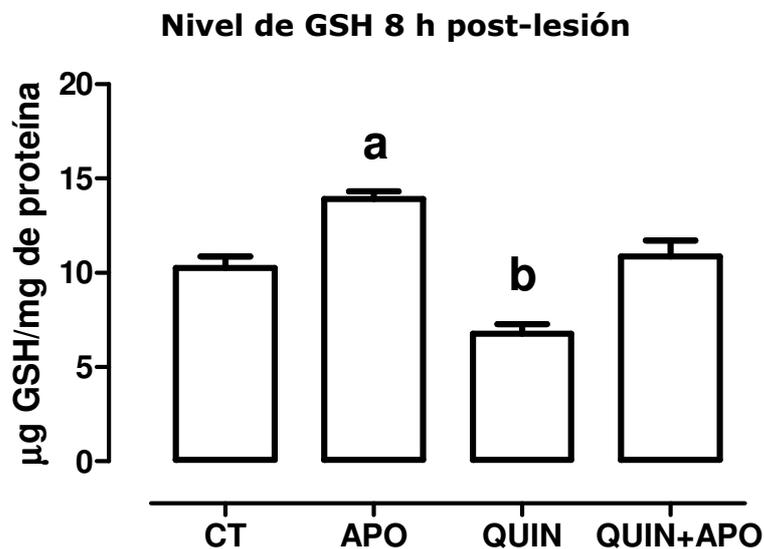
### **6.5 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media y se analizaron por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey o t-student, usando el programa Graph Pad Prism 5.01. Un valor de P<0.05 se consideró estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Nivel de GSH

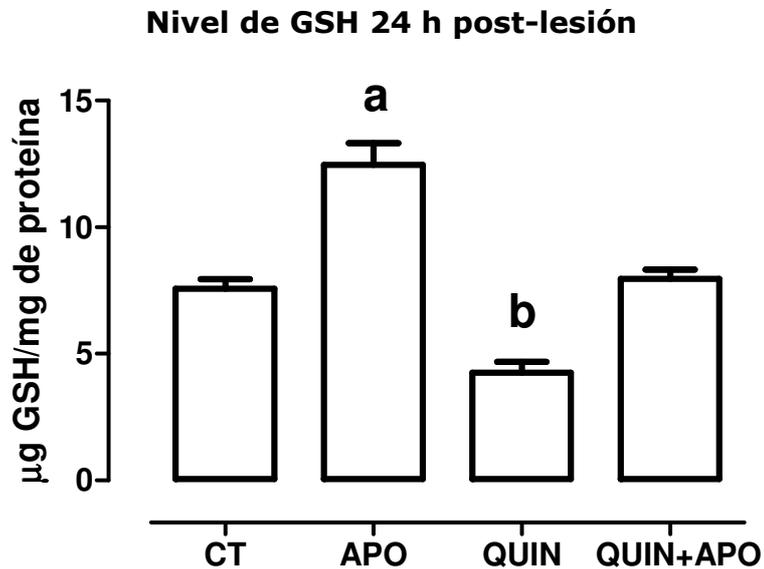
El nivel de GSH disminuyó significativamente a las 8 h post-lesión, en el grupo tratado con QUIN con respecto al grupo control (Figura 1). En el grupo tratado con APO se observa un incremento significativo en el nivel del antioxidante (Figura 1). Así mismo, se observó que el tratamiento con APO previene la disminución en el nivel de GSH inducidos por el QUIN (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto de la APO sobre el nivel de GSH en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 8 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se utilizó un ensayo fluorométrico para la determinación de GSH. <sup>a</sup>P<0.01 vs. el grupo CT. <sup>b</sup>P<0.01 vs. el grupo CT y QUIN+APO.

A las 24 h post-lesión, el nivel de GSH aumentó significativamente en el grupo tratado con APO comparado con el grupo control (Figura 2); mientras que la inyección intraestriatal con QUIN disminuyó significativamente la cantidad del antioxidante (Figura 2). El tratamiento

con APO previene la disminución del GSH causada por la toxina (Figura 2).

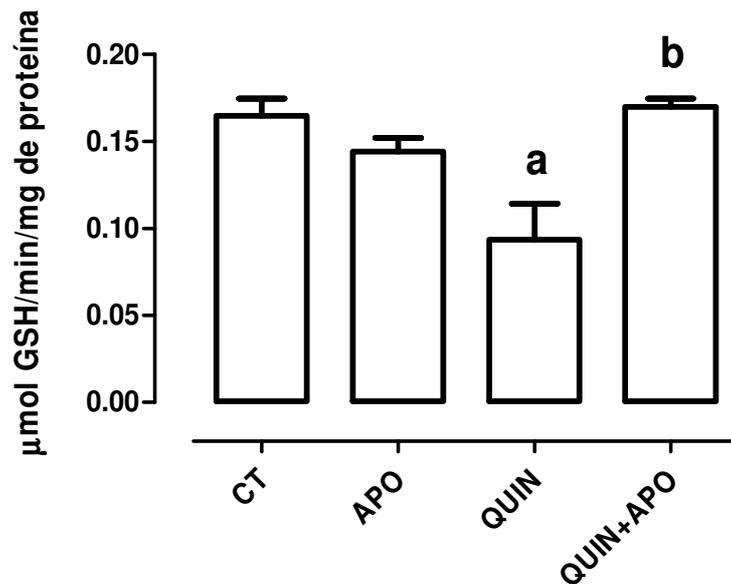


**Figura 2.** Efecto de la APO sobre el nivel de GSH en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 24 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se utilizó un ensayo fluorométrico para la determinación de GSH. <sup>a</sup>P<0.001 vs. el grupo CT. <sup>b</sup>P<0.001 vs. el grupo CT y QUIN+APO.

## 7.2 Actividad de la $\gamma$ -GCL

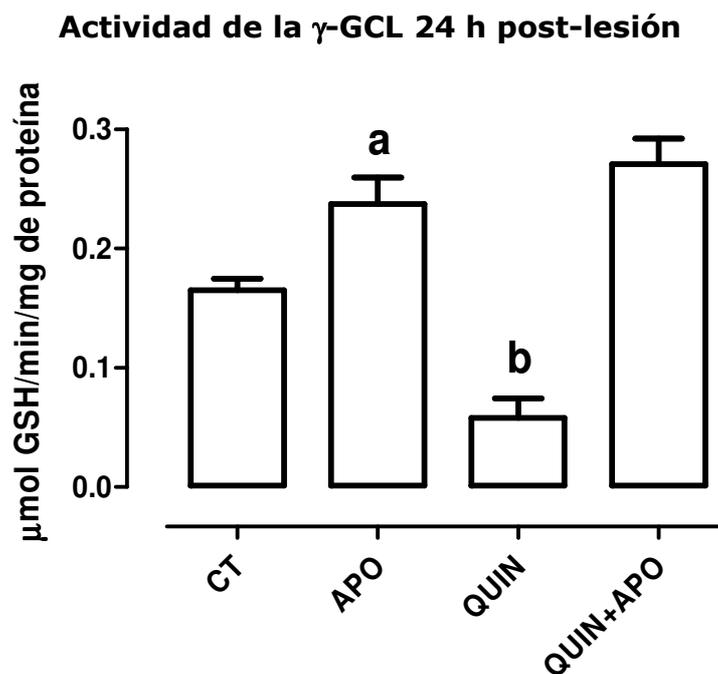
La actividad de la  $\gamma$ -GCL no mostró cambio significativo en el grupo APO (Figura 3), mientras que en el grupo tratado con la neurotoxina se observó una disminución significativa en la actividad enzimática con respecto al grupo control, 8 h después de la lesión (Figura 3). En el grupo QUIN+APO se puede observar que se previene la disminución en la actividad enzimática inducida por el QUIN (Figura 3).

### Actividad de la $\gamma$ -GCL 8 h post-lesión



**Figura 3.** Efecto de la APO en la actividad de la  $\gamma$ -GCL en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 8 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se midió la actividad enzimática por un ensayo fluorométrico. <sup>a</sup>P<0.01 vs. el grupo CT. <sup>b</sup>P<0.01 vs. el grupo QUIN.

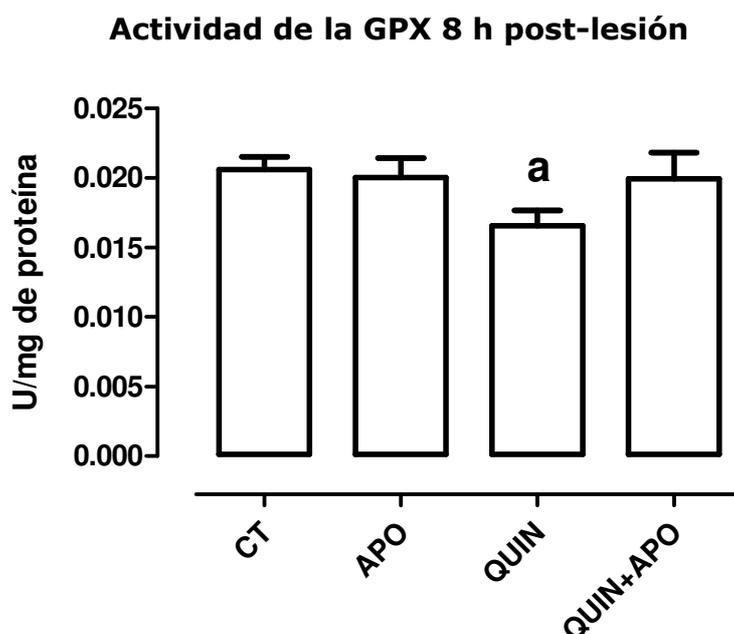
Después de 24 h de la administración del QUIN, la actividad enzimática de la  $\gamma$ -GCL se redujo significativamente con respecto al grupo control (Figura 4), contrariamente a lo observado en el grupo APO, pues en este grupo la actividad de la  $\gamma$ -GCL presentó un aumento significativo (Figura 4). El tratamiento con APO previene el daño ocasionado por la toxina (Figura 4).



**Figura 4.** Efecto de la APO sobre la actividad de la  $\gamma$ -GCL en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 24 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se midió la actividad enzimática por un ensayo fluorométrico. <sup>a</sup>P<0.0223 vs. el grupo CT, por t-student. <sup>b</sup>P<0.01 vs. el grupo CT y <sup>b</sup>P<0.001 vs. el grupo QUIN+APO.

### 7.3 Actividad de la GPX

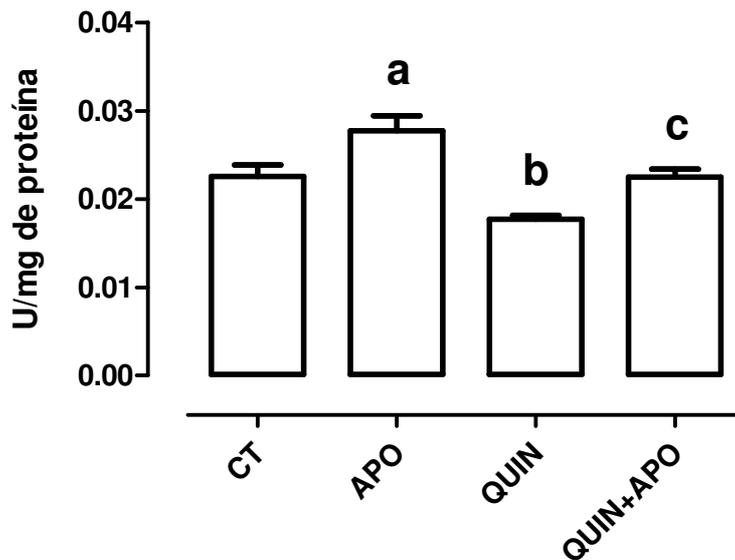
La actividad de la GPX 8 h post-lesión disminuyó ligeramente en el grupo tratado con QUIN con respecto al grupo control (Figura 5). Los grupos APO y QUIN+APO no presentaron cambios en la actividad de la enzima con respecto al grupo control (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto de la APO sobre la actividad de la GPX en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la administración intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 8 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se midió la actividad enzimática por un ensayo espectrofotométrico. <sup>a</sup>P<0.0195 vs. el grupo CT, por t-student.

Después de 24 h de la inyección con QUIN la actividad de la GPX se redujo significativamente en el grupo tratado con QUIN comparado con el grupo control (Figura 6). Por el contrario, se observa un aumento significativo en la actividad de la enzima en el grupo que recibió APO con respecto al grupo control (Figura 6). El tratamiento con APO previno la disminución en la actividad de la GPX inducida por el QUIN (Figura 6).

### Actividad de la GPX 24 h post-lesión

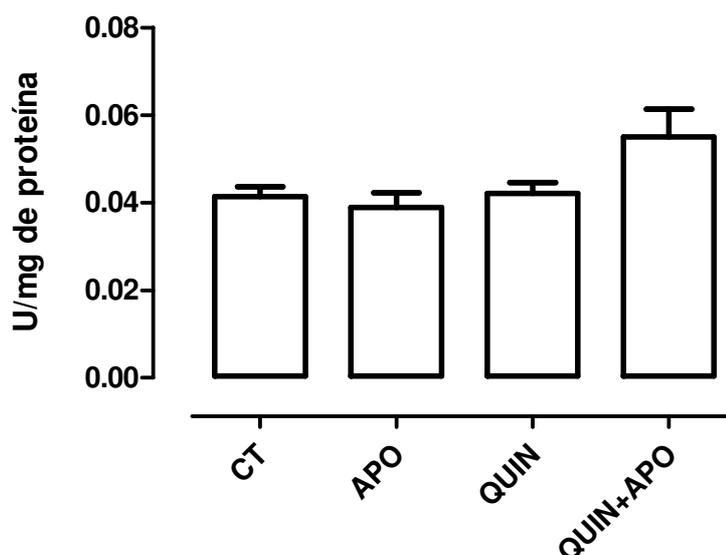


**Figura 6.** Efecto de la APO sobre la actividad de la GPX en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la administración intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 24 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se midió la actividad enzimática por un ensayo espectrofotométrico. <sup>a</sup>P<0.05 vs. el grupo CT. <sup>b</sup>P<0.05 vs. el grupo CT. <sup>c</sup>P<0.05 vs grupo QUIN, por t-student

#### 7.4 Actividad de la GST

No se observaron cambios significativos en la actividad de la glutatión-S-transferasa 8 h post-lesión en los grupos estudiados (Figura 7).

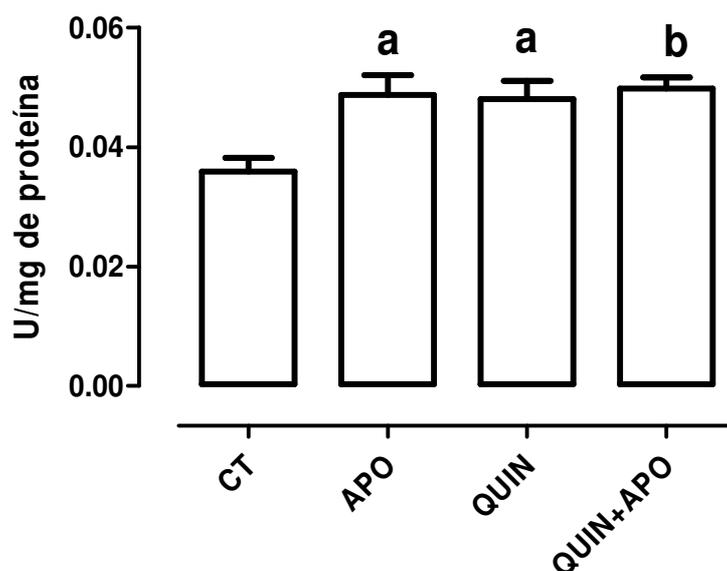
### Actividad de la GST 8 h post-lesión



**Figura 7.** Efecto de la APO sobre la actividad de la GST en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 8 horas después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se realizó un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad de la GST.

La actividad enzimática de la GST 24 h post-lesión se incrementó significativamente en los grupos APO, QUIN y QUIN+APO con respecto al grupo control (Figura 8).

### Actividad de la GST 24 h post-lesión

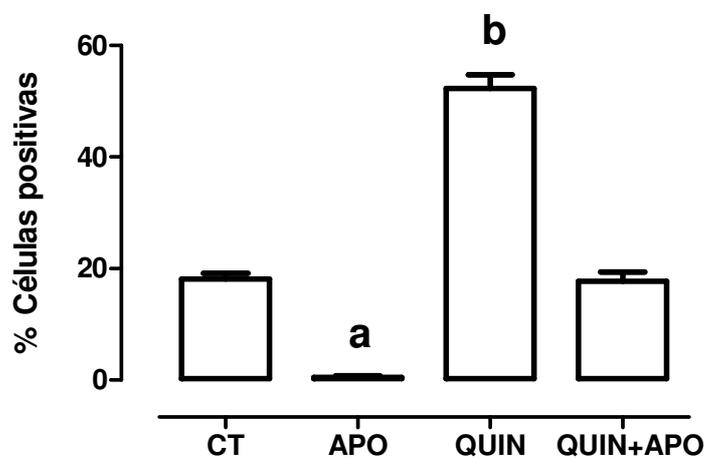
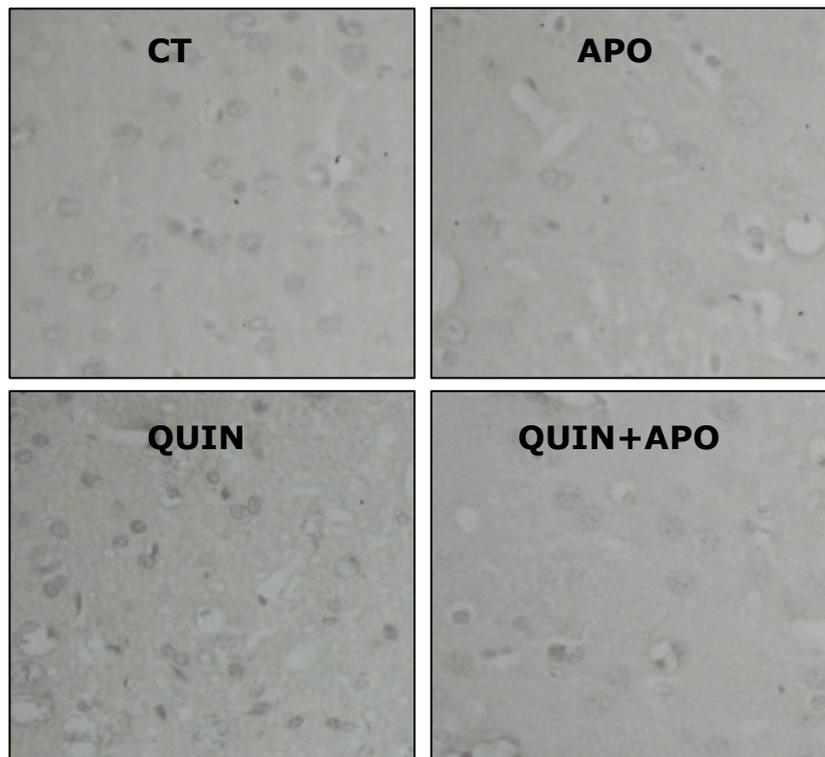


**Figura 8.** Efecto de la APO sobre la actividad de la GST en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 24 h después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro y se realizó un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad de la GST. <sup>a</sup>P<0.05 vs. el grupo CT. <sup>b</sup>P<0.01 vs. el grupo CT.

### 7.5 Nivel de poli-ADP ribosa

Se observó un aumento considerable en el porcentaje de células positivas para poli-ADP ribosa en el grupo al que se le administró QUIN comparado con el grupo control (Figura 9, panel superior y gráfica). Dicho aumento se previno en el grupo tratado con APO (Figura 9, panel superior y gráfica). Sorprendentemente, en el grupo al que se le administró APO no se observaron células positivas para poli-ADP ribosa (Figura 9, panel superior y gráfica).

### Nivel de poli-ADP ribosa 7 días post-lesión



**Figura 9.** Efecto de la APO sobre la formación de polímeros de ADP ribosa en el cuerpo estriado de ratas. Los animales recibieron APO (5 mg/Kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol) o solución salina. 7 d después de la administración de QUIN o solución salina, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro, se deshidrató y se incluyó en bloques de parafina para obtener secciones 5  $\mu$ m a las que se les realizó un ensayo inmunohistoquímico para detectar los polímeros de ADP ribosa. El panel superior muestra una fotografía representativa del ensayo inmunohistoquímico, en el panel inferior se muestra la gráfica de la cuantificación de las células positivas. <sup>a</sup>P<0.001 vs. el grupo CT, QUIN y QUIN+APO. <sup>b</sup>P<0.001 vs. el grupo CT y QUIN.

## **8. ANALISIS DE RESULTADOS**

Debido a que la patogénesis de la EH aún permanece sin resolverse completamente, se han desarrollado modelos experimentales que reproducen los síntomas neurobiológicos y clínicos de la enfermedad; los cuales pueden proveer una alternativa para el estudio de la patogénesis molecular que ocurre en la EH, la evaluación de tratamientos, así como la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas [Ferrante, 2009].

El modelo con QUIN [Schwarcz *et al.*, 1983] se utiliza para estudiar la fisiopatología de la enfermedad y además, permite evaluar diversas herramientas farmacológicas enfocadas a atenuar las alteraciones bioquímicas y conductuales del desorden.

Dentro de los mecanismos que se encuentran directamente involucrados en desencadenar las acciones neurotóxicas del QUIN, está la formación de radicales libres y el estrés oxidante/nitrante [Behan *et al.*, 1999; Santamaría *et al.*, 2003a,b]. Además, se sabe que tras la administración del QUIN se disminuye la capacidad antioxidante endógena [Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000].

Por otro lado, en diversas enfermedades neurodegenerativas (incluida la EH) se han observado alteraciones en el metabolismo del GSH, las cuales podrían estar implicadas en su patogénesis. Debido a que el GSH juega un papel importante en la supervivencia neuronal, los tratamientos que estimulen su síntesis o inhiban su degradación podrían disminuir la progresión de estas enfermedades [Schulz *et al.*, 2000; Díaz-Hernández *et al.*, 2005].

En un trabajo previo se encontró que la APO (administrada 30 min antes y 60 min después de la inyección intraestriatal con QUIN) previene las alteraciones conductuales y morfológicas que se inducen tras la administración del QUIN, efecto que se asoció con la inhibición de la NOX [Maldonado *et al.*, 2010]. Se ha descrito que el principal mecanismo de acción de la APO está asociado con su capacidad de

interferir con el ensamblaje de la NOX [Simons *et al.*, 1990]. Por ello, es un potente inhibidor intracelular de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  [Stolk, *et al.*, 1994]. Sin embargo, también se ha descrito *in vitro* en células epiteliales de pulmón, que la APO es capaz de incrementar el nivel intracelular de GSH a través del aumento en la expresión y la actividad de la  $\gamma$ -GCL [Lapperre *et al.*, 1999]; pero este mecanismo se ha explorado poco. Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó si la APO ejerce su efecto protector en el modelo con QUIN, mediante un mecanismo independiente de la inhibición de la NOX, como lo es el incremento en el nivel del principal antioxidante celular (GSH).

La inyección intraestriatal de QUIN disminuyó significativamente el nivel de GSH en ambos tiempos de estudio, estos resultados concuerdan con otros informes en los que se ha encontrado que las concentraciones celulares de GSH se reducen marcadamente ante un reto oxidante [Merad-Boudia *et al.*, 1998]. Además, esta disminución podría también estar asociada con la disminución en la actividad de la  $\gamma$ -GCL que se observa con el tratamiento con QUIN. Por otro lado, el tratamiento con APO previno la disminución en el nivel de GSH inducido por el QUIN, efecto que podría deberse a que la APO por si sola indujo un incremento en el nivel de este antioxidante.

Para evaluar si el incremento en el nivel de GSH se debe a un aumento en la actividad de la enzima limitante en su síntesis, se evaluó la actividad de la  $\gamma$ -GCL. El tratamiento con APO indujo un aumento significativo en la actividad de la  $\gamma$ -GCL solo a las 24 h, similar a lo que ya se ha informado en otros estudios [Lapperre *et al.*, 1999]. Es probable que el aumento en la actividad de la  $\gamma$ -GCL, se deba a que la APO incrementa la expresión del ARNm de la cadena pesada (subunidad catalítica) de la  $\gamma$ -GCL, como ya se ha demostrado en células epiteliales de pulmón [Lapperre *et al.*, 1999]. Adicionalmente, en este mismo trabajo se encontró que el aumento en el nivel del ARNm de la  $\gamma$ -GCL se

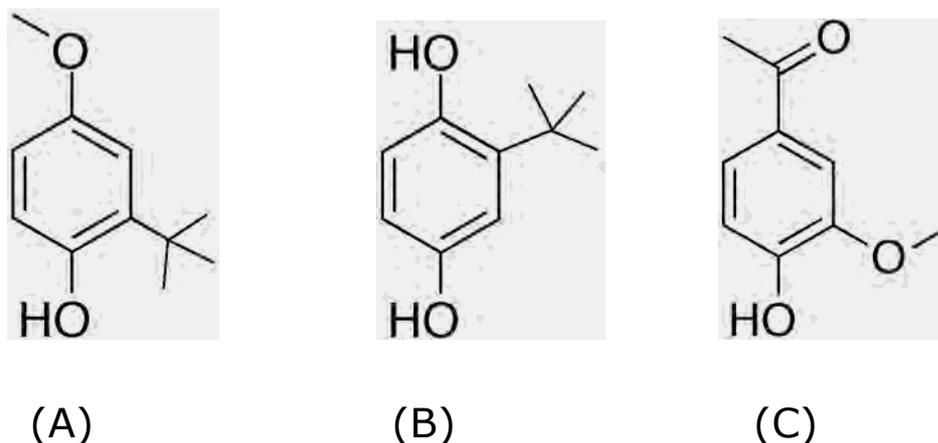
debe a que la APO activa el factor de transcripción AP-1. Por ello, es posible que el aumento que se observa a las 24 h en la actividad enzimática, podría deberse a que en este tiempo se completaron los mecanismos necesarios que inducen dicho aumento (activación de AP-1, el cual aumenta el ARNm y la cantidad de proteína de la  $\gamma$ -GCL, lo cual se refleja finalmente en el aumento de la actividad de la  $\gamma$ -GCL). En cambio, el ligero aumento que se observa en el nivel de GSH a las 8 h, podría deberse a que la APO inhibe a la NOX, una fuente de  $O_2^{\bullet-}$ , lo que podría generar un estado celular redox en el que se disminuye el consumo de GSH [Stefanska & Pawliczak, 2008]. Por otro lado, el tratamiento con APO previno la disminución inducida por el QUIN sobre la actividad de la  $\gamma$ -GCL a las 8 y 24 h, lo que podría explicar los resultados que se observan sobre el nivel de GSH, puesto que esta enzima es el paso limitante en la síntesis de este antioxidante.

Adicionalmente, se evaluó la actividad de dos enzimas que consumen GSH para degradar  $H_2O_2$ , hidroperóxidos y diferentes especies oxidantes: la GPX y la GST [Lu, 2009]. La actividad de la GPX disminuyó en el grupo tratado con QUIN similar a lo que ya se ha observado en otros modelos asociados con estrés oxidante [Maldonado *et al.*, 2003]. Este resultado puede deberse a que el estado oxidante que ocasiona el QUIN es severo y ocurre a tiempos cortos, por lo que el GSH se ocupa rápidamente para tratar de contrarrestar el estrés oxidante que enfrenta la célula; dejando una cantidad menor del antioxidante, por lo que la GPX disminuye su actividad al no tener sustrato. Además, ya se ha informado que diferentes enzimas antioxidantes, incluida la GPX, son inactivadas por diversas especies oxidantes como el  $O_2^{\bullet-}$ , el  $H_2O_2$  y el  $ONOO^-$  [MacMillan-Crown & Thompson, 1999; Padmaja *et al.*, 1998; Rister & Baehner, 1976] los cuales se generan tras la administración con QUIN.

Por otro lado, dado que el nivel de GSH aumentó con el tratamiento con APO, la recuperación en la actividad enzimática que se observa en el grupo QUIN+APO, podría deberse a que la GPX cuenta con el sustrato suficiente para contrarrestar el estrés oxidante que se genera después de la administración del QUIN.

La actividad de la GST incrementó a las 24 h post-lesión en el grupo tratado con QUIN. Esto era de esperarse ya que la GST se encarga de remover diferentes sustratos oxidantes, como lípidos oxidados y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre otros; los cuales se están generando tras la administración del QUIN y es posible que la GST aumente su actividad para tratar de eliminar dichos compuestos como ya se ha observado en otros modelos [Harish *et al.*, 2010].

La APO incrementó la actividad de la GPX y la GST, lo que sugiere que el mecanismo de acción de la APO podría estar asociado con su capacidad para activar o inducir algún factor de transcripción como: AP-1 que ya se ha descrito [Lapperre *et al.*, 1999] o Nrf-2. Se propone a Nrf-2 porque este factor de transcripción induce la expresión de una serie de proteínas y enzimas conocidas como "de fase 2", dentro de las cuales se encuentran la GPX y la GST. Adicionalmente, la APO presenta un parecido estructural con el butilhidroxianisol [Yuan *et al.*, 2006] y la t-butilhidroquinona [Lee *et al.*, 2003] (Esquema 12), ambos antioxidantes inductores del factor Nrf-2. Sin embargo, aún se tiene que explorar si la APO tiene la capacidad de inducir al factor Nrf-2.



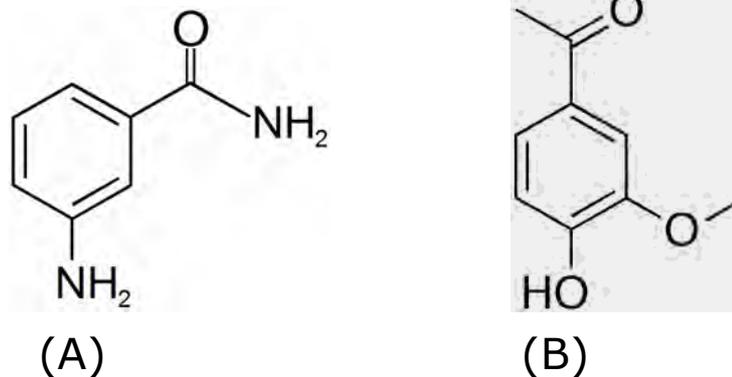
**Esquema 12.** Estructura química del butilhidroxianisol (A), la t-butilhidroquinona (B) y la apocinina (C).

Finalmente, la poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1) es la isoforma representativa de una familia de enzimas nucleares multifuncionales involucradas en el sistema de reparación de escisión de bases del ADN. La PARP-1 tiene un papel importante en la defensa contra el estrés oxidante. Sin embargo, su sobreactivación causa la depleción de NAD<sup>+</sup> y la subsiguiente muerte celular debida a la privación energética [Jagtap & Szabó, 2005]. Ya se ha descrito que la administración directa de QUIN en el estriado de ratas sobreactiva a la PARP-1 [Maldonado *et al.*, 2007; Braidy *et al.*, 2009].

En este estudio se encontró que la administración intraestriatal de QUIN incrementó significativamente la actividad de la PARP-1, lo que se evidenció a través del incremento en el número de células positivas para polímeros de ADP-ribosa (un marcador de la activación de la PARP-1) a los 7 días. El tratamiento con APO previno este incremento, ya que se observó una disminución significativa en el nivel de poli-ADP-ribosa inducido por el QUIN. Esto podría deberse a que el nivel del principal antioxidante celular no enzimático presentó una recuperación significativa en los grupos tratados con APO, por lo que al existir una mayor cantidad de grupos sulfhidrilos, la capacidad de contrarrestar el insulto oxidante es mayor y existe menor daño a las biomoléculas

susceptibles (lipidos, proteínas y ADN) y por lo tanto una menor activación de la PARP-1. Lo anterior es consistente con el hecho de que el tratamiento con APO previene el daño morfológico, así como las alteraciones conductuales inducidas por el QUIN [Maldonado *et al.*, 2010].

Sorprendentemente, el grupo que recibió APO no presentó inmuno-reactividad contra los polímeros de ADP-ribosa, sugiriendo una posible inactivación de la PARP-1. Este resultado podría deberse a que la estructura química de la APO tiene un parecido estructural a un inhibidor de la PARP-1, la 3-aminobenzamida (Esquema 13) [Jagtap & Szabó, 2005], por lo que la APO *per se* podría estar actuando además como un inhibidor de la enzima. Sin embargo, es necesario realizar experimentos de actividad enzimática para comprobar o descartar dicha hipótesis.



**Esquema 13.** Estructura química de la 3-aminobenzamida (A) y la apocinina (B).

En resumen, se encontró un efecto neuroprotector de la APO, que podría estar relacionado con mecanismos independientes a la inhibición de la NOX, lo que ocurre a tiempos tempranos (2 h después de la administración del QUIN). Estos mecanismos involucran: 1) la inducción tardía (24 h) de la síntesis de GSH, debida al aumento en la actividad de

la  $\gamma$ -GCL; 2) el incremento en la actividad enzimática de la GPX y la GST a las 24 h post-lesión, que contrarrestan el estrés oxidante que se genera tras la administración del QUIN; y 3) la inhibición de la PARP-1, previniendo así su sobre-activación debida al estrés oxidante/nitrante y la posterior muerte por necrosis a causa del exceso en la producción de polímeros de ADP-ribosa y depleción de fuentes energéticas como  $\text{NAD}^+$  y ATP.

## **9. CONCLUSIÓN**

El tratamiento con APO incrementó la actividad de las enzimas  $\gamma$ -GCL, GPX y GST, así como el contenido de GSH; efecto que probablemente podría disminuir el daño oxidante inducido por el QUIN.

## 10. REFERENCIAS

- Aguilera P, Cháñez-Cárdenas ME, Floriano-Sánchez E, Barrera D, Santamaría A, Sánchez-González DJ, Pérez-Severiano F, Pedraza-Chaverrí J, Jiménez PD. 2007. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 28: 1200-1207.
- Alonso ME, Ochoa A, Boll MC, Sosa AL, Yescas P, López M, Macias R, Familiar I, Rasmussen A. 2009. Clinical and genetic characteristics of Mexican Huntington's disease patients. *Mov Disord*. 24: 2012-2015.
- Armstrong RN. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*. 10: 2-18.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*. 3: 205-214.
- Bartosz G. 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*. 77: 1303-1315.
- Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 87: 245-313.
- Behan WM, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. 1999. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol*. 128:1754-1760.
- Braidy N, Grant R, Adams S, Brew BJ, Guillemin GJ. 2009. Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res*. 16: 77-86.
- Browne SE, Beal MF. 2006. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 8: 2061-2073.
- Chiarugi A, Calvani M, Meli E, Traggiai E, Moroni F. 2001. Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages. *J Neuroimmunol*. 1: 190-198.
- Circu ML, Aw TY. 2008. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res*. 42: 689-706.
- Diaz-Hernandez JI, Almeida A, Delgado-Esteban M, Fernandez E, Bolanos JP. 2005. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J Biol Chem*. 280: 38992-39001.

- Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, *et al.* 1995. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*. 269: 407-410.
- Fan MM, Raymond LA. 2007. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 81: 272-293.
- Ferrante RJ. 2009. Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim Biophys Acta*. 1792: 506-520.
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 30: 1-12.
- Franco R, Cidlowski JA. 2009 Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*. 16: 1303-1314.
- Fusco FR, Chen Q, Lamoreaux WJ, Figueredo-Cardenas G, Jiao Y, Coffman JA, Surmeier DJ, Honig MG, Carlock LR, Reiner A. 1999. Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J Neurosci*. 19: 1189-1202.
- Gil JM, Rego AC. 2008. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci*. 27: 2803-2820.
- Gusella JE, MacDonald ME. 1995a. Huntington's disease. *Semin Cell Biol*. 6: 21-28.
- Gusella JF, MacDonald ME. 1995b. Huntington's disease: CAG genetics expands neurobiology. *Curr Opin Neurobiol*. 5: 656-662.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 249: 7130-7139.
- Harish G, Venkateshappa C, Mythri RB, Dubey SK, Mishra K, Singh N, Vali S, Bharath MM. 2010. Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: Implications for Parkinson's disease. *Bioorg Med Chem*. 18: 2631-2638.
- Harjes P, Wanker EE. 2003. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*. 28: 425-433.

- Helder DI, Kaptein AA, van Kempen GM, van Houwelingen JC, Roos RA. 2001. Impact of Huntington's disease on quality of life. *Mov. Disord.* 16: 325–330.
- Hissin PJ, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissue. *Anal Biochem.* 74: 214–226.
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. 1993. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem.* 268: 19675–19680.
- Jagtap P, Szabó C. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 421–40.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang Gh, Nukina N. 2001. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet.* 10: 1049–1059.
- Jones DP. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* 348: 93–112.
- Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, *et al.* 1994. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med.* 330: 1401–1406.
- Landles C, Bates GP. 2004. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5: 958–963.
- Lanska DJ. 2000. George Huntington (1850–1916) and Hereditary chorea. *J Hist Neurosci.* 9: 76–89.
- Lapperre TS, Jimenez LA, Antonicelli F, Drost EM, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, Rahman I. 1999. Apocynin increases glutathione synthesis and activates AP-1 in alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 443: 235–239.
- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 278: 12029–12038.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265–275.
- Lu SC. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 30: 42–59.

- MacMillan-Crown LA, Thompson JA. 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 366: 82–88.
- Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. 2003. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med.* 35: 317-324
- Maldonado PD, Chánez-Cárdenas ME, Barrera D, Villeda-Hernández J, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is involved in the neuronal death induced by quinolinic acid in rats. *Neurosci Lett.* 425: 28–33.
- Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2010. NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res.* 88: 620–629.
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827: 65-75.
- McGeer EG, McGeer PL. 1976. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature.* 263: 517–519.
- Merad-Boudia M, Nicole A, Santiard-Baron D, Saillé C, Ceballos-Picot I. 1998. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 56: 645-55.
- Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258: 597-603.
- Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 349: 1–6.
- Paulson HL. 1999. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 339–345.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press.
- Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Hernández-Pando R. 2000. Garlic

ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Mol Cell Biochem.* 211: 69-77.

- Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortíz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A. 2004. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int.* 45: 1175-1183.
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, Macnee W, Smith CA. 1996. Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 229: 832-837.
- Raymond LA. 2003. Excitotoxicity in Huntington disease. *Clin Neurosci Res.* 3: 121-128.
- Rister M, Baehner RL. 1976. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest.* 58: 1174-1184.
- Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 858: 436-439.
- Ross CA, Wood JD, Schilling G, Peters MF, Nucifora FC, Cooper JK, Sharp AH, Margolis RL, Borchelt DR. 1999. Polyglutamine pathogenesis. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354: 1005-1011.
- Rubinsztein DC, Carmichael J. 2003. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Med.* 5: 1-21.
- Santamaría A, Flores-Escartín A, Martínez JC, Osorio L, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Jiménez-Capdeville ME, Manjarrez J, Ríos C. 2003a. Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radic Biol Med.* 35: 418-427.
- Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport.* 12: 2693-2696.
- Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville ME,

- Ali SF. 2003b. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem.* 86: 479-488.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 21: 172-188.
  - Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267: 4904-4911.
  - Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. 2010. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 90: 230-245
  - Schwarcz R, Whetsell WO Jr, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science.* 219: 316-318.
  - Schwarcz R. 2004. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. *Curr Opin Pharmacol.* 4: 12-17.
  - Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. 1994. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem.* 269: 26512-26517.
  - Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27: 916-921.
  - Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP. 1990. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med.* 8: 251-258.
  - Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E. 2008. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med.* 45: 667-678.
  - Stefanska J, Pawliczak R. 2008. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008: 1-10.
  - Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 11: 95-102.
  - Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.* 45: 309-379.

- Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem.* 93: 611-623.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* 72: 971-983.
- Trushina E, McMurray CT. 2007. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience.* 145: 1233-1248.
- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552: 335-344.
- Vámos E, Pardutz A, Klivenyi P, Toldi J, Vecsei L. 2009. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci.* 283: 21-27.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 44: 559-577.
- White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem.* 318: 175-180.
- Wolfensberger M, Amsler U, Cuénod M, Foster AC, Whetsell WO Jr, Schwarcz R. 1983. Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett.* 41: 247-52.
- Yang H, Zeng Y, Lee TD, Yang Y, Ou X, Chen L, Haque M, Rippe R, Lu SC. 2002. Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone. *J Biol Chem.* 277: 35232-35239.
- Yuan X, Xu C, Pan Z, Keum YS, Kim JH, Shen G, Yu S, Oo KT, Ma J, Kong AN. 2006. Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Pharm Res.* 23: 2621-2637
- Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vecsei L. 2009. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm.* 116: 1403-1409.
- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. 1995. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet.* 11: 155-163.