

169
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"INDUCCIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS
IN VIVO POR UN METABOLITO DEL L-TRIPTOFANO
(ÁCIDO QUINOLÍNICO) EN UN MODELO DE LA
COREA DE HUNTINGTON EN LA RATA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Inducción de la Peroxidación de Lípidos in vivo por un metabolito del L-Triptofano (Acido Quinolinico) en un modelo de corea de Huntington en la rata.

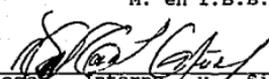
T E S I S

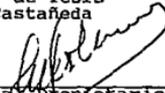
Q U E P R E S E N T A

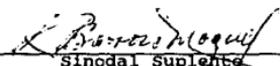
Abel Santamaria Del Angel

Aprobada por:


Presidente del Jurado y Director de Tesis
M. en I.B.B. Luis Camilo Ríos Castañeda


Asesor Interno y Sinodal
Dra. Margarita Victoria García Garduño


Sinodal Propietario
Dr. Julio Moyán Andrade


Sinodal Suplente
Dra. Rosario Barroso Moguel


Sinodal Suplente
Dra. María Luisa Fanjöl de Moles

III. INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCION.....	8
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1. La corea de Huntington (HD).....	12
2.1.1. Hallazgos histopatológicos en HD.....	21
2.1.2. Hallazgos neuroquímicos en HD.....	24
2.1.3. Hallazgos genéticos en HD.....	32
2.1.4. Aspectos terapéuticos en HD.....	34
2.1.5. Modelos experimentales de HD.....	37
2.2. El ácido quinolínico (QUIN) en HD.....	42
2.2.1. Bioquímica del QUIN.....	45
2.2.2. Antagonistas de los efectos del QUIN.....	48
2.2.3. Mecanismos de neurotoxicidad del QUIN.....	51
2.2.3.1. Excitotoxicidad y papel del calcio intracelular	52
2.2.4. El QUIN y los receptores para N-Metil-D-Aspartato	56
(NMDA).....	56
2.3. La peroxidación de lípidos como posible mecanismo	57
neurotóxico del QUIN.....	57
2.3.1. Radicales libres y la peroxidación de lípidos.....	59
2.3.2. Efectos de la peroxidación de lípidos en sistemas	63
biológicos.....	63
2.3.3. El calcio y los eventos pro-oxidantes.....	66
2.3.4. Evidencias de la promoción del estrés oxidativo	69
inducido por QUIN en cerebro de rata <i>in vitro</i>	69
2.4. Evaluación de la peroxidación de lípidos.....	70
2.4.1. El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA).....	71
2.4.2. El ensayo de los productos lipídicos fluorescentes	72
de la peroxidación.....	72
2.4.3. Otros métodos de evaluación.....	73
2.5. Relación entre la peroxidación de lípidos y la corea	76
de Huntington.....	76
3. OBJETIVOS.....	79
4. HIPOTESIS.....	80
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	81
5.1. Materiales.....	81
5.1.1. Animales.....	81
5.1.2. Reactivos.....	81
5.2. Métodos.....	83
5.2.1. Administración estereotáxica de ácido quinolínico.	83
5.2.2. Disección y obtención de estridos a tiempos	84
variables.....	84
5.2.3. El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA).....	85
5.2.4. El ensayo de evaluación de productos lipídicos	87
fluorescentes de la peroxidación.....	87

5.2.5. Evaluación conductual de la toxicidad del QUIN por la técnica de administración de apomorfina.....	88
5.2.6. Análisis estadístico.....	89
6. RESULTADOS.....	90
6.1. Efecto del QUIN en la peroxidación de lípidos en cuerpo estriado a diferentes tiempos después de su administración por la técnica del TBA.....	93
6.2. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de QUIN en la peroxidación de lípidos en cuerpo estriado a un sólo tiempo después de su administración por la técnica de evaluación de productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación	
6.3. Efecto de la administración del QUIN en la conducta de rotación inducida por apomorfina.....	95
7. DISCUSION.....	97
8. CONCLUSIONES.....	103
9. APENDICE. Neuroanatomía y Neurofisiología de Ganglios Basales.....	105
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	113

A B R E V I A T U R A S

HD - Enfermedad de Huntington
QUIN - Acido Quinolínico
KA - Acido Kainico
IBO - Acido Iboténico
KYNA - Acido Kinurénico
NMDA - N-Metil-D-Aspartato
GABA - Acido Gamma-Aminobutírico
GAD - Glutamato Descarboxilasa
ACh - Acetilcolina
CAT - Colina Acetiltransferasa
DA - Dopamina
MDA - Malondialdehído
TBA - Acido Tiobarbitúrico
TBARS - Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico
BHT- Hidroxitolueno Butilado
DFO - Desferrioxamina
LFP - Productos Lipídicos Fluorescentes de la Peroxidación
UF - Unidades de Fluorescencia
LP - Peroxidación de Lípidos
APO - Apomorfiná

1. INTRODUCCION

En años recientes ha tomado notable auge el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. En la última década, se han realizado investigaciones sobre este tipo de patologías, entre las que destacan la epilepsia, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, el mal de Wilson, etc.

La corea de Huntington se encuentra entre estas enfermedades. Fué descrita a finales del siglo pasado por George Huntington, en 1872, y ha sido estudiada con profundidad desde las últimas dos décadas.

La corea de Huntington es una enfermedad poco frecuente. Un informe (1) internacional hace referencia a que la frecuencia de aparición de este mal es de 5 a 10 personas por cada 100,000. Sin embargo, existen áreas de alta prevalencia tales como el oeste de Escocia, así como la región del Lago de Maracaibo, en Venezuela, en donde la proporción oscila entre 1,000 y 7,000 personas por cada 100,000. En contraste, algunos grupos étnicos tales como los japoneses y los negros americanos presentan una frecuencia de expresión muy baja (menos de 3 personas por cada 100,000). Estos patrones de distribución podrían obedecer a factores de migración, aislamiento geográfico y/o factores genéticos aún no determinados (1).

En México, salvo un informe aislado (2), no existe información acerca de la frecuencia de expresión y distribución

de la corea de Huntington. Este informe hace referencia a un estudio sobre la incidencia de enfermedades neurológicas hereditarias observadas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez" (I.N.N.yN. "M.V.S.", S.S.) durante la segunda mitad de la década de los 80's, por lo que los datos reportados no son representativos del país. En tal estudio, de un total de 6,258 pacientes, sólo 13 correspondieron al diagnóstico de la enfermedad de Huntington, representando apenas el 0.20 % de la población investigada (2).

Debido a su naturaleza hereditaria, una buena parte de las investigaciones realizadas sobre la corea de Huntington se han orientado hacia su componente genético y los resultados de tales hallazgos nos permiten saber hoy que se trata de un padecimiento de origen monogénico. Sin embargo, aún falta ahondar en este tipo de estudios para caracterizar al gen y al locus responsables de las alteraciones observadas en la enfermedad.

Por otra parte, los investigadores clínicos se han avocado a la descripción del padecimiento, y más recientemente a su diagnóstico molecular, sin obtener avances en lo referente a su tratamiento. Por esta razón es necesario establecer las bases moleculares que producen las alteraciones típicas de la enfermedad. Por ello, la existencia de modelos experimentales que reproduzcan las características conductuales, histológicas, fisiológicas y neuroquímicas observadas en la enfermedad, es de gran importancia en la experimentación que conduzca a la

explicación de los mecanismos fisiológicos implicados en la patología. Al respecto, se han usado neurotoxinas tales como el ácido kainico (KA), el ácido iboténico (IBO), etc., como posibles modelos para estudiar la patología de la corea. Dentro de este grupo de neurotoxinas destaca el ácido quinolinico (QUIN) que se ha empleado como el mejor modelo experimental para reproducir las características del mal de Huntington. Esta excitotoxina es un metabolito que se produce de manera natural en el tejido cerebral, por lo que se ha postulado su actividad neurotóxica como un posible factor en la etiología de la corea de Huntington.

En el presente trabajo investigamos un posible mecanismo neurotóxico de acción del ácido quinolinico en el modelo experimental de la corea de Huntington. Este proceso es la peroxidación de lípidos, el cual es un mecanismo de daño celular involucrado en la etiología de otros padecimientos neurológicos, y cuyos efectos fisiológicos implican la destrucción celular por la acción de los radicales libres sobre las membranas celulares. Este proceso es evaluado a través de incrementos de concentraciones de la toxina y de series de tiempo, además de realizar comparaciones con otros agentes tóxicos del sistema nervioso en relación a su capacidad para promover la peroxidación de lípidos y el estrés oxidativo por la generación de radicales libres. En este trabajo, la peroxidación de lípidos es evaluada por técnicas específicas de monitoreo de sustancias que son productos terminales de este proceso. Los resultados son

discutidos en términos de la relación del proceso de excitotoxicidad y la peroxidación de lípidos y extrapolados a los posibles mecanismos tóxicos que pueden estar ocurriendo en la corea de Huntington.

2. ANTECEDENTES

2.1. La corea de Huntington (HD)

Reportada formalmente por primera vez en el año de 1872 por George Huntington, del Colegio de Médicos y Cirujanos de la Universidad de Columbia, U.S.A., la enfermedad de Huntington (HD) fué descrita como un padecimiento hereditario asociado a la demencia y a alteraciones del movimiento (3).

Se asigna genéricamente el nombre de corea (del latín chorea, y éste del griego choreia: danza ritual o baile que solía acompañarse de canto) a ciertas afecciones en las que el síntoma principal es la aparición de movimientos involuntarios, rápidos, desordenados, irregulares, de gran amplitud y sin finalidad aparente, aunque tienen gran parecido con los movimientos voluntarios. Pueden afectar las más diversas regiones musculares (músculos faciales, del lenguaje y de las extremidades) y se diferencian del temblor por su carácter irregular y su rápido desarrollo (4).

La corea de Huntington está clasificada dentro del grupo de coreas de tipo degenerativo, junto con la corea senil. La familia de las coreas incluye 8 tipos fundamentales de enfermedades coréicas de acuerdo con su origen: 1) Degenerativas, 2) Metabólicas (que incluyen a la degeneración hepatolenticular o enfermedad de Wilson y a la coreoacantocitosis), 3) por infecciones agudas (que incluyen a la corea reumática o de

Sydenham, por Difteria, por Rubéola y por Encefalitis), 4) de origen vascular (por Lupus Eritematoso sistémico y por infarto sobre ganglios basales (núcleo caudado o núcleo subtalámico)), 5) de origen endócrino (por tirototoxicosis y corea gradivaria), 6) corea inducida por drogas (por agentes neurolépticos, anticonvulsivantes como fenitoina y carbamazepina, anticonceptivos orales, levodopa y otros agonistas de la dopamina y por antieméticos como la prometazina y metoclopramida), 7) corea paroximal o coreoatetosis paroximal distónica y, 8) corea mixta (neoplasmosis de ganglios basales y hematoma subdural) (4). Debido a la duración de la enfermedad (15 a 25 años), el cuadro poco específico de manifestaciones conductuales cognitivas y emocionales, la latencia de las manifestaciones motoras características y la falta de información sobre la enfermedad, así como la carencia de un método de diagnóstico molecular adecuado y disponible, en muchas ocasiones se confundió a esta patología con otras coreas o con otras enfermedades neurológicas (tales como el mal de Parkinson, epilepsia, etc.), especialmente cuando no se contaba con una historia clínica adecuada y con información sobre los antecedentes coréicos de la familia y un seguimiento diagnóstico y clínico temporal de la misma (4).

A partir de las características inicialmente descritas por George Huntington sobre la enfermedad: a) "su naturaleza hereditaria", b) "la tendencia a la insalubridad, y en ocasiones a una forma de insalubridad que conduce al suicidio", y c) "una

enfermedad que se manifiesta sólo en la vida adulta" (3), la corea de Huntington ha sido estudiada en detalle desde las últimas décadas del siglo pasado hasta nuestros días. Actualmente, las manifestaciones clínicas reconocidas comunmente en la evolución de la enfermedad han permitido una mejor caracterización de la misma. Los movimientos involuntarios coreicos de las extremidades y de la región facial representan las manifestaciones motoras generalizadas de la corea. Con el progreso de la enfermedad, gradualmente se manifiestan características distónicas y parkinsonicas, así como disturbios motores que se extienden al tronco y a la orofaringe. Estas alteraciones conducen a falta de coordinación progresiva, inmovilidad, inseguridad, disartria, dificultades en la deglución de alimentos y disfagia (5). El control oculomotor se ve alterado en las fases tempranas de la enfermedad y se caracteriza por movimientos sacádicos verticales y horizontales rápidos de los ojos y anomalías en la fijación de los mismos que se van reduciendo con la evolución del mal (6).

Tanto el decline intelectual como la demencia son características invariables de manifestación gradual en el desarrollo de la enfermedad. El perfil general del decline intelectual se aproxima al patrón típico de una "demencia subcortical". La memoria y otras funciones cognitivas se ven alteradas en las fases tempranas de desarrollo de esta patología, mientras que las funciones centrales del lenguaje, coordinación y

operaciones verbales, salvo por la disartria, no son afectadas (7,8).

Algunas alteraciones emocionales son observadas en la corea de Huntington. Los cambios graduales tempranos en la personalidad de los pacientes incluyen: conducta antisocial, preocupación, violencia, así como disturbios afectivos (generalmente depresivos) y psicóticos. Los desórdenes afectivos aparecen en el 30-40 % de los pacientes, mientras que esquizofrenia y desórdenes psicóticos atípicos son observados en aproximadamente el 10 % de los pacientes. Existe, como consecuencia de lo anterior, una tendencia muy desarrollada a la violencia, por lo que hay riesgo de suicidio, modificándose dicha conducta solamente por alteraciones motoras y psiquiátricas más drásticas (8,9).

La edad aproximada a la cual las manifestaciones clínicas comienzan a observarse en el paciente (también llamada "edad de inicio o arranque") parece ser importante como un factor de influencia en las características clínicas y en el desarrollo de la enfermedad. Sólo el 10 % de los pacientes presentan estas manifestaciones en la niñez y adolescencia. Estos pacientes juveniles presentan típicamente características parkinsónicas y distónicas prominentes, patrones corélicos mínimos y marcados disturbios en el lenguaje y motilidad ocular. En contraste, los pacientes con la enfermedad de Huntington con una edad de inicio en la etapa adulta, posterior a los 50 años, presentan un curso progresivo menos acelerado de la misma (10,11,12).

En décadas recientes, la evaluación longitudinal (en el tiempo) de las manifestaciones clínicas de la corea por métodos refinados, ha permitido una caracterización más precisa de las alteraciones funcionales y el decline emocional e intelectual en la corea de Huntington (13). Todos los pacientes con esta enfermedad muestran una disminución progresiva de su capacidad funcional. Los síntomas y signos emergen gradualmente, manteniéndose durante muchos años antes de la confirmación del diagnóstico. Los notables cambios cognitivos y emocionales no son, sin embargo, suficientemente específicos para diagnosticar la enfermedad antes del desarrollo de signos motores extrapiramidales (5,14,15).

En las etapas tempranas (I y II) de la enfermedad, las tareas ocupacionales y domésticas son descuidadas y gradualmente abandonadas conforme a la aparición de cambios de personalidad y demencia. Como resultado del desarrollo de alteraciones motoras en la etapa III, la capacidad del paciente de cuidarse a sí mismo desaparece eventualmente. Durante las fases terminales (IV y V) hay invalidez total del enfermo, y por lo tanto, éste requiere de muchos cuidados. La muerte generalmente ocurre por alteraciones respiratorias que conducen a la neumonía, acompañada de la pérdida progresiva de peso provocada por la disfagia. Algunos pacientes mueren por suicidio, aunque la mayoría vive durante el inexorable desarrollo de la enfermedad por espacio de 15 a 25 años (5,15).

Se han realizado estudios sobre la enfermedad en las poblaciones y las variantes clínicas de la misma permiten saber hoy que la tasa de prevalencia de la corea de Huntington a nivel mundial es aproximadamente de 5 a 10 personas por cada 100,000, con áreas localizadas de alta prevalencia en el oeste de Escocia y en la región del Lago Maracaibo en Venezuela, en donde hay una tasa aproximada de 1,000 a 7,000 casos por cada 100,000. En ciertos grupos étnicos tales como los Japoneses y Negros Americanos, el número de casos es notablemente bajo. Se especula acerca de la posibilidad de que factores como los patrones de migración de las poblaciones, aislamiento geográfico y factores genéticos no determinados, tengan alguna influencia sobre las variaciones en la prevalencia de la enfermedad (1,16). En la Figura 1, se muestra la proporción de casos de pacientes con corea de Huntington, en relación con el número de casos de pacientes con otras enfermedades neurológicas estudiadas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, D.F., en 1989 (2).

El diagnóstico de la enfermedad de Huntington presenta ciertas dificultades. No hay aún técnicas bioquímicas, radiológicas o marcadores genéticos definitivos para el diagnóstico. En los pacientes cuya edad de inicio se presenta en la etapa adulta, que manifiestan corea, y con un historial familiar clínico positivo, el diagnóstico puede ser sencillo. Sin embargo, en pacientes con edad de inicio en la etapa adulta y

- A Enfermedades Neurológicas de Origen Etiológico no Hereditario.
- B Epilepsia.
- C Depresión.
- D Parálisis Facial.
- E Otras Enfermedades con un Componente Genético.
- F Esquizofrenia.
- G Retardo Mental.
- H Neurocisticercosis.
- I Cefaleas por stress.
- J Migraña.
- K Foco Psicótico.
- L Mal de Parkinson.
- M Enfermedad de Alzheimer.
- N Corea de Huntington.

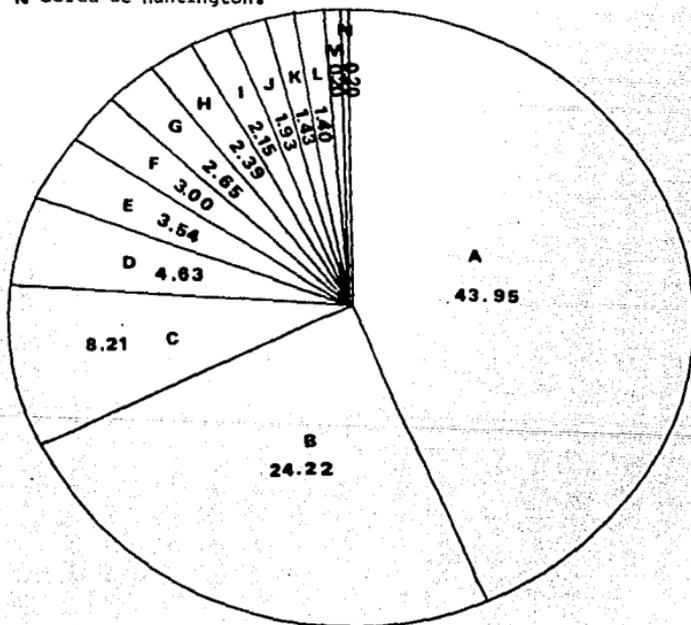


FIG. 1. Incidencia porcentual de enfermedades neurológicas de una población estudiada del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez", México, D.F., 1988 (según Alonso, M.E. et al. 1989).

pequeñas manifestaciones coreícas o tan sólo con manifestaciones en la etapa adulta o historial familiar positivo, el diagnóstico se vuelve dudoso (17). El más confiable de los criterios clínicos de diagnóstico es la manifestación de movimientos coreícos. Es esencial, sin embargo, identificar en la historia familiar un pariente afectado por la enfermedad. Se sabe que la corea de Huntington tiene un origen monogénico, con un componente autosómico dominante de penetración completa. El criterio para establecer a un paciente como afectado por la corea de Huntington incluye un historial familiar positivo, una confirmación serológica del paciente y sus parientes, transmisión genética de la enfermedad, y en los casos de muerte, una confirmación por autopsia. Las técnicas de diagnóstico molecular son comunmente empleadas para la predicción de la enfermedad (18).

Una de las razones de emprender un diagnóstico seguro para una enfermedad incurable, como lo es la corea de Huntington, es la posibilidad del paciente de anticiparse a las manifestaciones de la misma y, en consecuencia, contar con criterios suficientes para tomar decisiones sobre su vida futura. Es decir, si contraerán matrimonio o no, o si tendrán hijos o no, y cuántos deben tener. Sin embargo, con esta posibilidad de diagnóstico anticipado mediante la aplicación de pruebas predictivas tales como la G-8, se ha incrementado la controversia existente acerca de las consideraciones éticas del diagnóstico previo. El riesgo de poder saber con anticipación si el sujeto manifestará la

corea, puede llevar a otro tipo de problemas psicológicos no menos serios, tales como la depresión y el suicidio. Ante tal posibilidad, muchos pacientes se han negado a la realización de la prueba o al conocimiento del resultado de la misma (19,20).

Algunas de las técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Huntington empleadas durante la década pasada fueron: electroencefalografía, monitoreo-CAT, potenciales evocados visuales y prueba de reflejos-H, como parte de estudios de electromiografía. También fueron empleadas adaptaciones específicas de ciertas evaluaciones fisiológicas y anatómicas, tales como la evaluación de movimientos oculomotores, análisis de reflejos, etc. Finalmente, se recurrió al análisis de varios parámetros bioquímicos y de desarrollo tisular tales como cultivo de tejidos de linfocitos y fibroblastos, evaluación de corea relacionada a levodopa y concentraciones de GABA en líquido cefalorraquídeo. Actualmente, nuevas técnicas son exploradas como posibilidades para la predicción de la enfermedad (por ejemplo: resonancia magnética nuclear, tomografía de emisión de positrones (PET) para la evaluación de cambios en el metabolismo de la glucosa y pruebas de espectroscopia de fluorescencia a nivel de la membrana), sin embargo, la prueba G-8 es hasta el momento el mejor método de predicción dada la carencia de precisión de las otras pruebas (21).

Las técnicas de biología molecular, ejemplificadas por la prueba original G-8, representan una forma nueva y diferente de

métodos predictivos. Dichas pruebas se fundamentan en la investigación de las alteraciones genéticas, a nivel molecular, de la corea de Huntington (21).

La prueba G-8 se basa en el estudio del polimorfismo del fragmento largo de restricción (RFLP) en la región cromosómica relacionada a la enfermedad. Se demostró en el reporte original, en 1983 (22), que diferentes formas de RFLP están asociadas con el gen causante de la corea de Huntington, representando una prueba de diagnóstico aplicable a detección presintomática y/o prenatal. El DNA necesario para la determinación del genotipo en el locus G-8 puede ser obtenido de cualquier tejido (sangre, células amnióticas, tejido cerebral, etc.) y comparado contra patrones controles, almacenados en bancos de DNA. Sin embargo, la posibilidad de existencia de un segundo locus u otro cromosoma que en un momento dado pudieran favorecer la expresión de la enfermedad, confieren a la prueba una precisión predictiva del 95 %, por lo que la combinación de pruebas de diagnóstico, como la tomografía de emisión positrónica (PET) y la evaluación de polimorfismos del DNA, pueden resultar complementarias y conferir al diagnóstico predictivo mayor certeza (21). Así pues, la posibilidad de contar con pruebas predictivas cada vez más precisas, implica a su vez la planeación de aspectos éticos más adecuados.

El Cuadro A resume algunas de las manifestaciones clínicas más importantes de la corea de Huntington.

C U A D R O A
MANIFESTACIONES CLINICAS
DE LA COREA DE HUNTINGTON

- - Enfermedad neurodegenerativa de origen hereditario, autosómica dominante con una baja frecuencia de expresión en la población (4-7 en 100,000).
- - Se expresa en la edad madura del individuo (30 - 50 años).
- - Movimientos coreiformes involuntarios progresivos.
- - Cambios conductuales cognitivos y emocionales (alteraciones psiquiátricas, agresividad, depresión y desinterés).
- - Demencia.
- - Disfagia.
- - Disartria.

2.1.1. Hallazgos histopatológicos en HD

La descripción de las alteraciones macro y microscópicas del sistema nervioso en la corea de Huntington comenzó desde principios del presente siglo (23,24,25).

La apariencia general del cerebro de los pacientes que murieron a consecuencia de la enfermedad es anormal. Usualmente el tamaño del cerebro es muy pequeño y con atrofia visible media a moderada en la corteza cerebral, preferencialmente en los lóbulos frontales y los parietales, en muchos casos el peso normal del cerebro disminuye en un 20 a 30 %. Las secciones coronales del cerebro a nivel de la cabeza del núcleo caudado, muestran una marcada atrofia del cuerpo estriado y la resultante dilatación de los ventrículos laterales. En lugar del típico abultamiento del núcleo caudado dentro de la pared del ventrículo lateral, se presenta una cavidad donde sólo quedan restos del mismo. Pueden ser observados grados menores de atrofia y pérdida celular en globus pallidus y tálamo. En muchos casos, el tallo cerebral, médula espinal, substantia nigra y cerebelo muestran una apariencia normal (26). Puede haber considerable variación de los cambios observados a nivel microscópico, pero cuando éstos están presentes, el diagnóstico patológico suele ser muy confiable. En los casos juveniles, el grado de atrofia puede ser más severo (26).

La patología a nivel macroscópico se refleja particularmente

en la pérdida neuronal en la corteza cerebral, núcleo caudado y putamen. La pérdida neuronal en la corteza tiende a ser predominante en la tercera, cuarta y quinta capas corticales. Los altos contenidos de lipopigmentos detectados, sugieren proliferación astrocítica. Aunque en el núcleo caudado y el putamen aproximadamente el 60 a 70 % del tejido puede perderse, se ha observado que las células pequeñas del estriado están más frecuentemente involucradas en los procesos patológicos que las células grandes y alargadas. Es de gran interés el hecho de que el concepto de una "enfermedad de células pequeñas" esté más relacionado con corea y que una "enfermedad de células largas" tenga mayor relación con enfermedades de tipo rígido, como la misma variante rígida de la enfermedad de Huntington (27,28,29). Existe controversia sobre la relación entre el tipo de células que son afectadas en la enfermedad y el tipo de variaciones de la misma. Ha llegado a postularse que la variante de rigidez puede involucrar el daño selectivo de una porción del estriado, el globus pallidus, substantia nigra u otras regiones (30).

A nivel microscópico se observa gliosis, particularmente en el cuerpo estriado, siendo éste un proceso vinculado a la pérdida neuronal y al daño tisular y no un incremento real en las células gliales. Dado que la pérdida neuronal desarrolla más las células astrogliales en el cuerpo estriado, éstas se vuelven predominantes. La respuesta glial no es, pues, un evento secundario, aunque se desconoce si puede jugar un papel activo en

la muerte neuronal (31,32).

Los hallazgos histopatológicos de la corea de Huntington se derivan de estudios de impregnación por la técnica de Golgi y las nuevas técnicas de tinción. Cinco diferentes tipos de neuronas han sido delineados en el cuerpo estriado humano, incluyendo dos tipos de neuronas espinosas de tamaño mediano (con procesos espinosos abundantes o dispersos), dos tipos de neuronas no-espinosas (de tamaño mediano y largo) y una clase separada de pequeñas neuronas. Las neuronas espinosas de tamaño mediano constituyen el 80 % de todas las neuronas estriatales (31). La relación diferencial de estas neuronas en los procesos patológicos de la corea de Huntington aún no se conoce, sin embargo, se ha demostrado que en el cuerpo estriado de pacientes con la enfermedad, la morfología de las dendritas de las neuronas espinosas de tamaño mediano se ve alterada por la aparición de terminales recurvadas y apéndices, un cambio en la densidad de espinas, y anomalías en el tamaño y forma de las mismas. Los cambios patológicos son poco frecuentes en las neuronas no-espinosas de tamaño mediano o largo. Estos hallazgos de degeneración en las neuronas espinosas asociados con la corea, apoyan la idea de que una población específica de neuronas neocorticales está involucrada selectivamente en este mal. La pérdida de estas neuronas espinosas de tamaño mediano se correlaciona con la disminución de ciertos neurotransmisores y moduladores (GABA, sustancia-P, encefalinas) en el cerebro de los

pacientes (33).

Existe evidencia reciente de una marcada distribución regional de la pérdida celular en el estriado. La destrucción neuronal parece menor en el estriado ventral (nucleus accumbens) y en las fases tempranas de la enfermedad, dicha región permanece normal. Esta misma pérdida selectiva se observa en el putamen ventral anterior (34,35,36).

2.1.2. Hallazgos neuroquímicos en HD

Los estudios regionales de varios neurotransmisores, transmisores putativos y neuromoduladores en la corea de Huntington han tenido gran auge a raíz del hallazgo de la disminución regional de dopamina en el cuerpo estriado de pacientes que murieron a causa de la enfermedad de Parkinson, lo que condujo a considerar la disminución selectiva de algún neurotransmisor como posible causa de los trastornos asociados con la enfermedad de Huntington. También tomaron gran ímpetu las investigaciones sobre otros posibles factores asociados con la enfermedad, tales como los metales pesados, con base en los disturbios inducidos por el cobre en la enfermedad de Wilson. Sin embargo, no se encontró una relación de este tipo en la corea de Huntington (21) hasta que recientemente se comprobó que existen notables alteraciones en el contenido de cobre y hierro en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), así como en la substantia nigra de cerebros de pacientes con corea de Huntington

postmortem, al ser comparados contra cerebros de pacientes control (37). Estas alteraciones pueden estar asociadas con los procesos neurodegenerativos que involucran alteraciones metabólicas vinculadas a los procesos oxidativos.

El interés por el estudio del sistema dopaminérgico en la corea de Huntington está basado en dos aspectos importantes: la anormalidad en los niveles de dopamina en la enfermedad de Parkinson y el hecho de que los agentes farmacológicos más efectivos para el tratamiento de la corea tienen sus principales efectos sobre el sistema dopaminérgico (36). Aunque los informes iniciales sugirieron cambios pequeños o nulos en la concentración de la dopamina estriatal, hallazgos posteriores describen cierto incremento en la concentración de la dopamina en el cuerpo estriado, substantia nigra y nucleus accumbens, sugiriendo que esto puede deberse inicialmente a la pérdida del tejido en el cuerpo estriado atrofiado, o bien, a factores como la pérdida de fibras GABAérgicas aferentes del estriado a la substantia nigra, provocando además una pérdida retrógrada de dopamina de las terminales dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal (36,38).

Por otra parte, algunos agentes farmacológicos que interfieren con la actividad de la dopamina, tienen un efecto terapéutico en la corea, lo cual ha permitido proponer que los receptores dopaminérgicos se vuelven hipersensibles como parte del proceso neurodegenerativo (39), permaneciendo esta hipótesis sin ser comprobada y existiendo además evidencia de una pérdida

notable de receptores dopaminérgicos en la enfermedad (40). Una explicación alternativa a esto pudiera implicar que la hiperactividad en neuronas dopaminérgicas nigroestriatales resulte en un incremento en la síntesis y liberación de dopamina sobre los receptores dopaminérgicos remanentes. Esto pudiera deberse a la reducida inhibición del sistema dopaminérgico estriatal debida a la degeneración de la vía metabólica del GABA, aunque estudios de cerebros de pacientes con la enfermedad de Huntington y cerebros de animales lesionados con ácido kainico muestran que las proyecciones nigro-estriatales se adaptan a la pérdida de neuronas estriatales que normalmente inhiben la actividad dopaminérgica (41). Otros estudios establecen que el recambio de dopamina puede estar disminuido en la corea de Huntington y sobre la consideración del incremento relativo de dopamina estriatal, se ha postulado que la pérdida de las células pequeñas en el estriado de los coreicos puede producir un incremento en la tasa de dopamina por receptor, lo que pudiera explicar la eficacia parcial de drogas antidopaminérgicas (42).

Se ha reportado que la concentración de GABA (ácido gamma-aminobutírico) disminuye hasta en un 60 % en el cuerpo estriado, pero no en la corteza frontal o en cerebelo de pacientes con corea de Huntington, mientras que la actividad de la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico, la enzima de síntesis del GABA a partir del ácido glutámico) disminuye en cuerpo estriado y permanece normal en la corteza frontal (43). Se ha observado

también que la actividad de la GAD puede verse afectada por el status premortem de los enfermos: si los pacientes mueren después de un cuadro clínico complicado (coma, hipoxia y neumonía), la actividad de la GAD disminuye notablemente, aunque los niveles de GABA no se vean alterados. La reducción del 50 % o más de GABA y de la actividad de la GAD ha sido interpretada mediante la hipótesis de que las neuronas espinosas estriatales de tamaño mediano que contienen GABA son las que degeneran en la enfermedad (44,45).

La disminución en la concentración de GABA estriatal ha sido relacionada con la vía eferente del cuerpo estriado a substantia nigra y a globus pallidus. Se ha reportado un incremento en el número de sitios de alta afinidad de los receptores para GABA en substantia nigra de pacientes con corea de Huntington (43). Dicho incremento en receptores GABAérgicos se ha explicado como un fenómeno derivado de la denervación de las neuronas estriatales GABAérgicas.

Por otra parte, la actividad de la colina acetiltransferasa (CAT), la enzima de síntesis de la acetil-colina, disminuye también en la enfermedad, reflejando la degeneración de las interneuronas colinérgicas estriatales (46,47). Así mismo, se ha observado una pérdida de los sitios colinérgicos muscarínicos de unión específica. Los efectos sobre el sistema colinérgico carecen de uniformidad y varían de acuerdo a la evolución del mal. Sin embargo, a diferencia de la enfermedad de Alzheimer, la

actividad cortical de la CAT se preserva.

El papel de las vías noradrenérgicas centrales en la corea de Huntington no es muy relevante. Los niveles de norepinefrina estriatal se encuentran normales o ligeramente incrementados (48). Dado que no existen cambios patológicos relevantes del locus coeruleus y los niveles de norepinefrina se mantienen normales en las otras regiones cerebrales, parece que no hay relación entre este sistema y la expresión de la enfermedad. Las concentraciones estriatales de serotonina también permanecen normales o ligeramente incrementadas, mientras que en el líquido cefalorraquídeo permanecen normales (49).

La sustancia-P, un neuropéptido encontrado en ganglios basales, se ha postulado como un neurotransmisor excitador de la vía eferente del estriado a la substantia nigra. La sustancia-P y el GABA tienen actividad antagónica sobre las neuronas dopaminérgicas. En la corea de Huntington, la concentración de sustancia-P en el globus pallidus y en la substantia nigra disminuye hasta en un 90 %, mientras que en núcleo caudado disminuye en un 50 % y en la zona compacta de la substantia nigra se observa un tercio de la concentración normal, afectando la pars reticulata y la pars compacta. Se ha postulado la idea de que la pérdida de sustancia-P ocurre en las proyecciones de las vías estriato-palidal y estriato-nigral. En líquido cefalorraquídeo, la sustancia-P permanece normal (50,51).

La colecistocinina (CCK), un péptido gastrointestinal que está presente en el sistema nervioso central, se encuentra disminuida en los ganglios basales de enfermos coréicos, especialmente en el globus pallidus y en la substantia nigra. También se ha reportado pérdida de receptores para la CCK (52). Por su parte, el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), otro péptido gastrointestinal del sistema nervioso central, no modifica sus concentraciones (53). Adicionalmente, las concentraciones de met-enkefalina en globus pallidus y substantia nigra de enfermos coréicos se encuentran disminuidas (51). A pesar de que se ha sugerido que las encefalinas modulan el recambio (turnover) de dopamina en los ganglios basales, no se ha encontrado una relación clara entre la disminución de las encefalinas y las manifestaciones de la enfermedad de Huntington.

Aunque la concentración postmortem de glutamato en el estriado de los pacientes es normal (54), se cree que la patogénesis de la corea de Huntington puede ser explicada por la sobreproducción de glutamato o de otro aminoácido excitador en las etapas tempranas de la enfermedad.

La actividad de la enolasa específica neuronal (una enzima glicolítica) disminuye, al igual que la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la cual convierte a la angiotensina I en el octapéptido angiotensina II, que actúa como neurotransmisor en el cerebro, lo que sugiere una función aberrante de la angiotensina como un factor etiológico importante

en la corea de Huntington (16,55).

Por otra parte, se ha reportado un incremento en la concentración de somatostatina (SS) y de neuropéptido-Y en la corea de Huntington (56,57). Dado que el metabolismo de la SS permanece normal en la enfermedad, se ha sugerido que el incremento en su concentración se deba a una destrucción desigual de neuronas que contienen a este neuropéptido. Mediante técnicas histoquímicas de tinción (NADPH-diaforasa) se observó que las neuronas no espinosas estriatales que no fueron dañadas en la enfermedad de Huntington, contenían SS y neuropéptido-Y (58).

Los estudios sobre receptores para neurotransmisores en la corea han revelado que en general, disminuye el número de sitios de unión para los neurotransmisores en el estriado. Se ha observado disminución en el número de receptores colinérgicos muscarínicos, así como disminución en receptores para benzodiazepinas, GABA y dopamina, siendo más evidentes estos cambios en el núcleo caudado (59,60). En contraste con lo anterior, se reportó un incremento en los receptores benzodiazepínicos en la corteza cerebral medio-frontal de los enfermos, lo que puede implicar una patología cortical focal (59). Recientemente, se han observado anomalías y una gran disminución en el número de receptores para N-Metil-D-Aspartato (subtipo de receptores para aminoácidos excitadores) en el cuerpo estriado de pacientes con corea de Huntington, así como notables anomalías en las proyecciones de neuronas estriatales y en

receptores para NMDA en pacientes presintomáticos (61,62), apoyando la hipótesis de que la activación prolongada de dichos receptores está involucrada en la patogénesis de la enfermedad.

Adicionalmente, se ha observado disminución en las concentraciones de algunos aminoácidos (prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina y tirosina) en plasma y tejido cerebral de pacientes con la enfermedad (4). El significado de estos hallazgos no es claro, pero pueden ser auxiliares en el diagnóstico de esta enfermedad.

Finalmente, algunas de las alteraciones del sistema dopaminérgico en la corea de Huntington han conducido al estudio de posibles anormalidades neuroendócrinas. El papel de la dopamina en la secreción de las hormonas pituitarias, particularmente la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina, han conducido a numerosos estudios del eje pituitaria-hipotálamo. Sin embargo, los resultados de tales investigaciones son conflictivos para su interpretación debido a la administración de tratamientos con neurolépticos a los pacientes y a un inadecuado control de los sujetos estudiados. Sólo se han observado pequeños cambios en GH y prolactina regulados por alteraciones en los metabolismos de algunos neurotransmisores, sin embargo, esta parece ser un área de investigación que comienza a ser explorada con mayor detalle (16).

2.1.3. Hallazgos genéticos en HD

Mediante la aplicación a nivel molecular de tecnología del DNA recombinante a poblaciones que manifestaron la enfermedad, se demostró que un segmento del DNA del brazo corto del cromosoma 4 está estrechamente relacionado con el gen causante de la enfermedad de Huntington (22,63). Por digestión enzimática de este marcador de DNA, cuatro patrones o haplotipos pudieron ser detectados, demostrando un patrón de segregación particular del gen causante de la corea. Las frecuencias de haplotipos variaron en los dos pedigrees analizados (uno de Venezuela y el otro de Norte América). Con suficiente información acerca de la distribución de los haplotipos en las poblaciones estudiadas durante largo tiempo, es posible hacer predicciones prenatales, e incluso, in utero, sobre la expresión del gen causante de la corea.

En la actualidad se exploran nuevas áreas de investigación que involucran estudios de la edad de inicio de la enfermedad, el efecto del sexo del padre que es el transmisor, e investigaciones genéticas a nivel molecular, y se ha observado que la variabilidad en la edad de inicio es menor dentro de una sola familia que entre las familias (21).

El concepto de "anticipación", que se refiere a la tendencia de la sintomatología de aparecer cada vez a edad más temprana en cada generación sucesiva, no ha sido validado por la falta de

consistencia de los argumentos (64).

Factores demográficos, edad reproductiva, clima y estrés ocupacional son algunos de los factores ambientales que han sido postulados con influencia sobre la edad de inicio de la enfermedad (65). Adicionalmente, se ha propuesto que las variaciones en la edad de inicio están relacionadas a formas alélicas separadas (66). Un factor importante relacionado a la edad de inicio es el sexo del padre afectado. Un paciente juvenil con la enfermedad, generalmente proviene de una familia donde el padre fué afectado por la misma (67,68). Este hallazgo sugiere que el cromosoma X tiene alguna manera de modificar el efecto del gen de la corea, aunque la controversia se presenta en el hecho de que el mal de Huntington juvenil presenta una distribución de sexos equitativa. Una explicación alternativa a este hallazgo radica en un factor de transmisión materno tal como un organelo citoplásmico o una modificación intrauterina materna desconocida (69). Dicho factor protector, que bien podría estar en una mitocondria, podría modificar la expresión del gen de la corea. Más aún, se ha propuesto que el inicio de la enfermedad está asociado a "genes de envejecimiento" heredados independientemente, y en el caso de la demora en el inicio de la enfermedad de los hijos cuya madre fué afectada por la corea, dichos genes podrían estar relacionados a algún factor transmitido por vía materna (64).

2.1.4. Aspectos terapéuticos en HD

Con respecto a la terapia de los pacientes con corea de Huntington, desafortunadamente no existe ningún tratamiento farmacológico totalmente eficaz hasta el momento. En algunos casos, cuando es posible controlar las manifestaciones coreicas, los cambios en la personalidad y en el estado mental del paciente continúan su evolución (70). Básicamente, la estrategia terapéutica intentada hasta este momento se ha centrado en tres sistemas de neurotransmisores: dopamina, GABA y acetilcolina.

Paradójicamente, los agentes farmacológicos que afectan el sistema dopaminérgico son los más eficaces para el control de la corea. Se cree que los agentes neurolépticos bloquean los receptores para dopamina, y de ellos se han empleado el haloperidol, la pimozida, la flufenazina, la clorpromazina, la trifluoperazina y la tioridazina, siendo también efectivos contra la irritabilidad, la paranoia, los cambios emocionales y la naturaleza violenta, pero no contra la demencia progresiva (70).

La reserpina, la tetrabenazina y la alfa-metilparatirocina (AMPT) son agentes farmacológicos que interfieren la función dopaminérgica central con diferentes mecanismos presinápticos de acción. Los dos primeros interfieren el almacenamiento de dopamina y otras monoaminas (como la serotonina) en las vesículas presinápticas. Estas drogas inhiben las manifestaciones coreicas, aunque pueden causar depresión y su efecto terapéutico es corto y

limitado (71). La AMPT bloquea la síntesis de dopamina por inhibición de la actividad de la tirosina hidroxilasa y es más efectiva cuando se le combina con alguna de las anteriores (72). La anfetamina, un agonista dopaminérgico, incrementa los movimientos coreícos en la enfermedad (73), en tanto que existen pocos reportes del efecto benéfico de la levodopa administrada crónicamente (74,75). La apomorfina (agonista de la dopamina), por su parte, no presenta efectos terapéuticos a bajas concentraciones mientras que en altas concentraciones incrementa los movimientos coreícos (76). La bromocriptina (otro agonista dopaminérgico), a bajas concentraciones no tiene efecto, y en altas concentraciones es altamente depresiva (77).

La administración del muscimol (un agonista GABA-érgico), la inhibición de las enzimas catabólicas del GABA (particularmente, la GABA transaminasa por administración de INH), la administración de GABA-gamma acetilénico, gamma-vinil GABA, ácido amino-oxiacético o valproato de sodio, así como la administración de THIP (4,5,6,7-tetrahidroisoxazol-(5,4,-c)piridin-3-ol, un agonista para los receptores GABA-érgicos), son algunas de las estrategias terapéuticas diseñadas para incrementar la actividad GABAérgica central, dada la notable disminución de este neurotransmisor en sistema nervioso central de pacientes con corea, así como la imposibilidad del mismo de atravesar la barrera hematoencefálica. Aunque se ha observado que los niveles del GABA se incrementan en el líquido cefalorraquídeo de

pacientes a los que se les ha practicado alguna de estas alternativas, no ha habido mejoría alguna en las manifestaciones de la enfermedad (78,79,80,81,82). El mecanismo de acción de la INH consiste en la inhibición de enzimas catabólicas del GABA por un metabolito del mismo, la hidrazina, el cual ha tenido efectos benéficos en algunos pacientes. Por su parte, el baclofen no ha funcionado satisfactoriamente (83).

Dada la notable disminución de acetilcolina en la corea de Huntington, otra alternativa terapéutica explorada ha sido tendiente a incrementar la concentración de dicho neurotransmisor, lo cual no ha funcionado probablemente debido a la carencia de respuesta mediada por la pérdida de receptores para acetilcolina (21). El deanol, un agente que incrementa los niveles de acetilcolina, tampoco ha funcionado (21). Los precursores de la acetilcolina (cloruro de colina o lecitina (fosfatidilcolina)) no han servido como terapia (84).

El incremento en las concentraciones de serotonina central (por administración de L-triptofano y 5-hidroxitriptofano) aumentan las manifestaciones coreicas, mientras que los antagonistas de la serotonina no tienen efecto terapéutico alguno (21).

Dado el incremento en las concentraciones de somatostatina en la enfermedad y su posible papel como estimulador dopaminérgico, se ha intentado disminuir sus niveles mediante

cisteamina, sin éxito alguno (85).

Algunas benzodiazepinas han sido empleadas para tratar la ansiedad y la depresión en la corea, con éxito parcial (21).

Actualmente, las alternativas de investigación sobre la terapia en la enfermedad de Huntington están orientadas hacia la localización precisa del locus para el gen de la corea, después de lo cual, éste podría ser clonado para la posible identificación del producto genético anormal, pudiendo así, caracterizar el mecanismo genético-celular de alteración. Las investigaciones farmacológicas siguen siendo infructuosas, pero también se confía en que la politerapia podría tener algunos efectos benéficos en subpoblaciones específicas de pacientes con la enfermedad (21).

2.1.5. Modelos experimentales en HD

Los estudios originales sobre la neurotoxicidad inducida por el glutamato, preferencialmente en neuronas espinosas del hipotálamo (86), condujeron a los investigadores a postular la teoría de la "excitotoxicidad", confiriéndole el nombre de "excitotoxinas" a algunas sustancias excitadoras (básicamente aminoácidos) cuya potencia neurotóxica correlacionó con sus efectos tóxicos en el sistema nervioso central (87,88). Los mecanismos de excitotoxicidad están basados en la sobreexcitación de las neuronas como resultado de la estimulación prolongada y continua de los receptores para aminoácidos

excitadores, lo que produce serias alteraciones en la fisiología de las neuronas, conduciéndolas a la muerte celular (88).

Las lesiones inducidas por el glutamato, que fué el primer aminoácido excitador en ser estudiado en sus efectos, se caracterizan por una notable pérdida dendrítica (incluyendo las espinas) así como una degeneración neuronal localizada, mientras que los axones y algunos elementos no neuronales sobreviven (86).

Este tipo de alteraciones han sido nominadas como "lesiones de axones protegidos" y son altamente específicas. Dichos estudios condujeron a postular al glutamato como modelo de enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia (86).

Trabajos posteriores con otros aminoácidos neuroactivos con similitudes estructurales al glutamato (89,90) administrados experimentalmente mediante su inyección intracerebral, han permitido investigar los mecanismos ligados a la excitotoxicidad. Dos de las sustancias más usadas en este sentido son el ácido kaínico (KA) y el ácido iboténico (IBO), que son aminoácidos heterocíclicos aislados de fuentes vegetales o fúngicas y que causan lesiones neuronales específicas cuando son aplicados intracerebralmente (91). Cuando son administradas en el cuerpo estriado de ratas, las lesiones observadas reproducen algunos de los cambios presentes en los cerebros de los enfermos de la corea de Huntington (92,93), mientras que administradas en el sistema límbico, han servido como modelos de ciertos tipos de epilepsias

(94), conduciendo a la idea de que los procesos etiológicos de estas enfermedades pueden ser causados por las propiedades excitotóxicas de algún compuesto endógeno. Las lesiones causadas por la inyección intracerebral de estas dos neurotoxinas, son ambas del tipo específico en el cual los axones neuronales se mantienen protegidos (95,96). Los mecanismos involucrados en la toxicidad de cada una de estas sustancias está mediada a través de receptores farmacológicamente distintos (97). Algunas diferencias notables en los procesos degenerativos inducidos por estas neurotoxinas radica en una susceptibilidad diferencial al daño por ácido kainico, particularmente en hipocampo, pero no al ácido iboténico (98). Adicionalmente, la potencia neurotóxica del ácido kainico es mayor a la del ácido iboténico, causando necrosis en áreas cerebrales distantes del sitio de inyección, lo que bien podría deberse a su potente efecto pro-convulsivante (99,100). Por lo anterior, el ácido kainico ha sido empleado más específicamente como modelo de epilepsia de lóbulo temporal (96). En relación con la corea de Huntington, la administración aguda de estas toxinas por vía intraestriatal, no reproduce las condiciones del desarrollo de la enfermedad. La inyección intraestriatal de ácido iboténico parece proveer un mejor modelo experimental de la enfermedad de Huntington que la inyección de ácido kainico, dado que las lesiones con este último ácido se extienden hasta el sistema límbico (101). Por otra parte, la degeneración neuronal en otras áreas extraestriatales que ocurre en la enfermedad, con el ácido kainico no ocurre (101,102).

En 1976, en los estudios realizados por Coyle y col. (92) se establece el empleo de ácido kaínico como el modelo más viable para reproducir las características histológicas, conductuales y bioquímicas de la corea de Huntington, lesionando neuronas GABAérgicas y colinérgicas, sin alterar neuronas dopaminérgicas. La actividad de algunas enzimas tales como la glutamato descarboxilasa y la colina acetiltransferasa, disminuyeron, al igual que en la enfermedad; sin embargo, a diferencia de la corea de Huntington, los niveles de dopamina, la actividad de la tirosina hidroxilasa y la recaptura de dopamina se incrementaron significativamente.

En 1990, Hantraye y col. (103), basados en estudios previos sobre la neurotoxicidad del ácido iboténico en hipocampo de rata (95), proponen a este último como modelo experimental de la corea de Huntington por la evaluación de parámetros conductuales y anatómicos de lesiones inducidas en el caudado-putamen de babuinos (primates no humanos), observándose una proliferación astrocítica, pérdida de fibras colinérgicas, sin alterarse las fibras dopaminérgicas. También fué observada una reducción de la metencefalina. Fueron analizadas las alteraciones conductuales tales como la corea, la distonía y la asimetría postural. Sin embargo, también una considerable alteración en los niveles de dopamina y en la actividad de la tirosina hidroxilasa, a diferencia de la enfermedad, así como algunas diferencias conductuales, limitan un tanto la reproducibilidad del modelo,

situándolo como una mejor alternativa experimental para explicar las alteraciones de la corea de Huntington en comparación con el modelo inducido por el ácido kainico, pero con ciertas limitaciones.

En 1986, Beal y col. (104) realizaron un estudio inmunohistoquímico comparativo entre múltiples sustancias neuroexcitadoras y sus efectos neurotóxicos sobre el cuerpo estriado de ratas, evaluando las alteraciones morfológicas y los perfiles neuroquímicos de esta región. Los niveles de somatostatina, neuropéptido Y, sustancia P, vasopresina, GABA y dopamina, fueron medidos después de la administración de ácido nicotínico, ácido tállico, ácido N-metil-D-aspartico, ácido iboténico, ácido kainico y ácido quinolínico en varias concentraciones. La finalidad de dicha comparación fué establecer cual de estas sustancias neuroactivas reproducía de mejor manera las características de la corea de Huntington. No se observaron cambios significativos después de la administración de ácido nicotínico ni de ácido tállico. Por su parte, tanto el ácido N-metil-D-aspartico, como los ácidos iboténico, kainico y quinolínico redujeron significativamente la inmunoreactividad a la sustancia P y los niveles de GABA, tal como se observa en la corea de Huntington, pero, exceptuando al ácido quinolínico, las otras tres sustancias también disminuyeron significativamente la inmunoreactividad a la somatostatina y al neuropéptido Y, contrario a lo que ocurre en la enfermedad. Las inyecciones de

ácido quinolinico, kainico, iboténico y tállico produjeron todas una zona de necrosis circundada por un área de pérdida total de neuronas. Sólo el ácido quinolinico mantuvo intactas a las neuronas que contenían somatostatina y neuropéptido Y, lo cual fué atribuido a la capacidad de dichas neuronas de metabolizar al ácido quinolinico (105), mediante la enzima NADPH-diaforasa (106), por lo que los autores postulan que dichas neuronas podrían captar al ácido quinolinico y metabolizarlo. Adicionalmente, este informe postula al ácido quinolinico como el mejor modelo experimental para reproducir las características de la corea de Huntington, dada la semejanza con las condiciones observadas en la enfermedad (107).

En el Cuadro 1 se encuentran resumidas algunas de las alteraciones observadas en la corea de Huntington y en los respectivos modelos experimentales inducidos por los ácidos quinolinico, kainico e iboténico después de su inyección en el cuerpo estriado de rata.

2.2. El ácido quinolinico (QUIN) en HD

Recientemente, el ácido quinolinico ha adquirido gran importancia en el estudio de los procesos patológicos, no sólo como modelo de la corea de Huntington, sino también en algunas alteraciones asociadas con otras enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (108), en donde se cree que los altos niveles registrados de este aminoácido en líquido

CUADRO 1. Perfiles neuroquímicos de la enfermedad de Huntington (HD), del cuerpo estriado de rata lesionado con kainato/ibotenato (KA/IBO) y con quinolinato (QUIN).

Sustancia Neuroactiva	HD	KA/IBO	QUIN
Acido γ -Aminobutírico/GAD	↓	↓	↓
Acetilcolina/ChAT	↓	↓	↓
Sustancia P	↓	↓	↓
Dopamina	NC	NC	NC
VGC, α -Melanina	NC	NC	NC
Somatostatina	↑	↓	NC
Neuropeptido Y	↑	↓	NC

↓=Disminuye, ↑=Aumenta, NC=No Cambia

Basado en la recopilación de Bruyn, R.P.M. and Stoof, J.C. 1990. J. Neurol. Sci. 95: 29-38.

cefalorraquídeo, puedan estar implicados en la demencia y en la atrofia cerebral observadas en estos enfermos. Adicionalmente, la neurotoxina ha sido empleada en modelos de epilepsia (109), en hipoxia (110) e isquemia (111). Se han observado cambios en los niveles de ácido quinolinico en el sistema nervioso en modelos de hipoglucemia (112), alcoholismo (113), en gliomas humanos (114), en síndromes neurológicos de hipertensión (115) y septicemia (116), entre otros, lo que sugiere una participación del metabolismo del ácido quinolinico en múltiples procesos patológicos del sistema nervioso.

Se ha propuesto al ácido quinolinico como el principal agente etiológico de la corea de Huntington. Una primera indicación de lo anterior viene de estudios previos en los cuales se demostraron los efectos excitotóxicos del ácido quinolinico (104,109). Otro aspecto importante en esta hipótesis es el hecho de que las lesiones provocadas por concentraciones submicromolares de esta toxina, pueden ser prevenidas por el pretratamiento con MK-801, un antagonista no competitivo de los receptores para NMDA (117), conduciendo a la idea de que las alteraciones observadas en la enfermedad podrían estar mediadas por la excitación de los receptores para NMDA (61,62).

Adicionalmente, se ha observado que varias regiones cerebrales de pacientes con corea de Huntington se presenta un incremento significativo en la actividad de la 3-hidroxiantranilato oxigenasa (la enzima de síntesis del ácido

quinolínico) (118). Aparentemente, el cerebro de los pacientes coreicos tiene una alta capacidad para generar la endotoxina. El hecho de que sus enzimas de síntesis y de degradación estén presentes en las células distintas sugiere que la síntesis de esta sustancia puede parcialmente ocurrir en células incapaces de degradarlo. Por ello, si tiene lugar una sobreproducción, el ácido quinolínico puede ser liberado al espacio extracelular y sobre-activar los receptores para NMDA.

En contraparte, los niveles de ácido quinolínico han sido evaluados tanto en líquido cefalorraquídeo (119), como en orina (120) y en cerebros postmortem (121), no encontrándose niveles significativamente elevados con respecto a los pacientes control. Sin embargo, parece prematuro establecer conclusiones definitivas al respecto con base en un número pequeño de pacientes como el que fué analizado en estos estudios (122). No debe excluirse la posibilidad de que en la fase inicial de la corea, las concentraciones de ácido quinolínico puedan estar elevadas, y en consecuencia, inducir todos los eventos tóxicos que se han observado (122). Debe enfatizarse que, como fué demostrado por Whetsell y Schwarcz en 1989 (123) y por Yamada y col. en 1990 (124), la exposición crónica del tejido a la toxina a muy bajas concentraciones (submicromolares) y su administración crónica en cuerpo estriado también a concentraciones bajas, pueden inducir una notable degeneración neuronal y pérdida de algunos neurotransmisores. Así, el papel del ácido quinolínico en la

etiología de la enfermedad de Huntington permanece incierto.

2.2.1. Bioquímica del QUIN

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridin-dicarboxílico (125)) fué identificado por primera vez por Wolfensberger y col. en cerebro de rata y en el tejido cerebral de rata y humano (126), y posteriormente en cerebro de ratón, conejo y otros mamíferos pequeños (127). En este primer informe (126) se observa que el ácido quinolínico está presente preferencialmente en núcleo caudado, corteza cerebelar y corteza frontal cerebral, concordando dichas regiones con lo encontrado en tejido cerebral de ratas. El segundo informe (127) establece que el ácido quinolínico está presente en corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral de varios mamíferos, y que su concentración aumenta en relación directa con la edad, de manera que en los animales "seniles", los niveles de dicha toxina son muy altos. Esto es de gran interés dado que el ácido quinolínico podría estar involucrado en algunos de los procesos de envejecimiento celular relacionados con la edad, siendo probablemente así un factor potencialmente activo en la degeneración neuronal espontánea que ocurre durante los cambios fisiológicos vinculados con la edad. Esta idea es interesante cuando se considera el hecho de que los efectos tóxicos inducidos por este metabolito endógeno sólo se han observado en tejido nervioso maduro (107), lo que refuerza la tendencia a pensar en un posible vínculo entre las alteraciones celulares relacionadas

a la edad y la sobreproducción de esta neurotoxina. El incremento observado en el ácido quinolínico se da preferencialmente en el cuerpo estriado y la corteza cerebral (127), regiones especialmente susceptibles a la toxicidad de este aminoácido (104,107,128), a los procesos patológicos encontrados en la corea de Huntington (30,31,32,33), y a los procesos de envejecimiento (129), existiendo así, múltiples puntos de concordancia.

El ácido quinolínico es un metabolito del triptofano que se forma en la vía metabólica de la kinurenina (130), que es la mayor vía oxidativa del catabolismo del triptofano. Dicha vía se encuentra representada y resumida esquemáticamente en la Figura 2.

Dada la gran cantidad de procesos oxidativos presentes en esta vía de oxidación total del triptofano, la generación de radicales libres durante dicho proceso es considerable (130).

Bajo condiciones normales, gran parte del triptofano catabolizado sigue la vía hasta formar acetyl-CoA. Sólo una pequeña proporción del metabolismo diario del triptofano deriva a otros metabolitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas de constante disposición de triptofano, la excreción de kinurenina y de metabolitos intermediarios se incrementa considerablemente (130).

La vía metabólica de la kinurenina ha sido identificada en cerebro, hígado, y esporádicamente en intestinos de humano, así

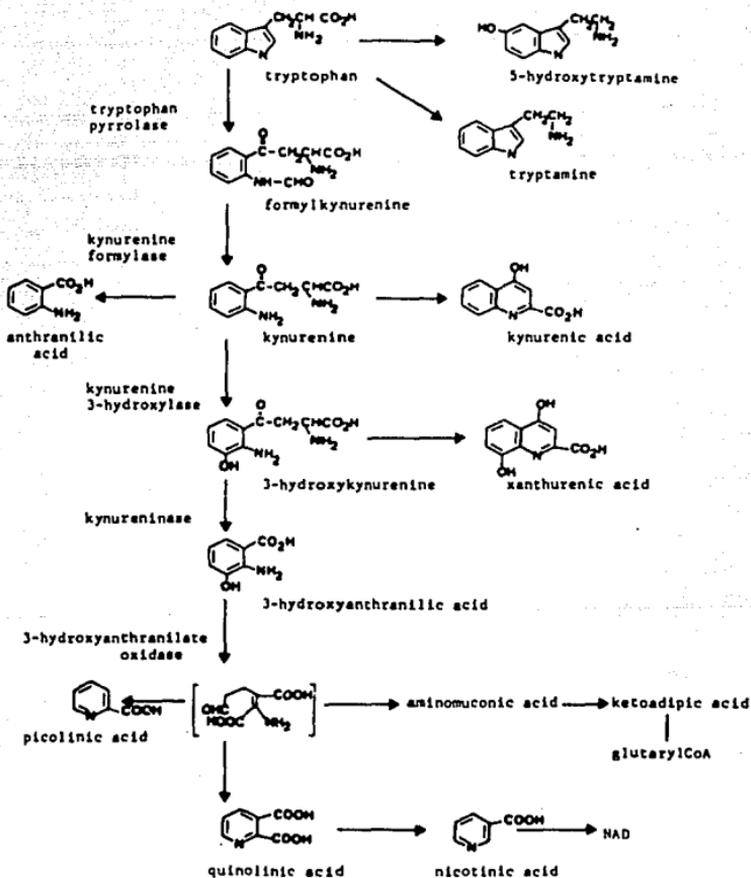


Fig.2. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism.

Tomado de J. of Neurol. Sciences Vol. 95 (Bruyn, RPM and Stoof, JC. 1990)

como en cerebro e hígado de rata y otros mamíferos pequeños (126,127,130). Sin embargo, se cree que su presencia en intestino humano tenga que ver con la presencia de bacterias y otros micro-organismos, las cuales presentan ésta y otras vías alternativas de catabolismo del triptofano (130). Muchos de los metabolitos del triptofano, incluido el ácido quinolinico, identificados en orina de humano, pueden, en consecuencia, ser atribuidos parcialmente a la acción de bacterias intestinales (130).

Algunos factores mencionados con anterioridad (109,110,111,112,113,114,115,116) pueden alterar esta vía en favor de la producción de metabolitos intermediarios.

De gran interés es el papel del ácido kainico en la alteración del metabolismo general del ácido quinolinico. Al ser administrado sistémicamente en corteza piriforme e hipocampo, además de producir un patrón típico de neurotoxicidad, el kainico incrementó significativamente la concentración de ácido quinolinico, la actividad de su enzima de síntesis (la 3-HAO) y mantuvo normales los niveles de actividad de la enzima de degradación de la neurotoxina (QPRT) (131). Estas notables alteraciones fueron atribuidas a la proliferación astrocítica en respuesta a la pérdida neuronal, lo cual justifica el incremento en los niveles de QUIN, dado que su síntesis se realiza, parcialmente, en las células astrogliales (131). Fueron observados daños secundarios, presumiblemente debidos a la

sobreproducción de ácido quinolínico.

Otros múltiples efectos biológicos del ácido quinolínico en el sistema nervioso han sido ampliamente reportados (132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142).

2.2.2. Antagonistas de los efectos del QUIN

Desde que se cuenta con el antecedente de que el bloqueo de los receptores para NMDA mediante antagonistas, puede prevenir el daño isquémico en el cerebro y los movimientos epileptiformes en modelos experimentales (143), así como el hecho de que los antagonistas no competitivos de estos receptores, como son la ketamina, la fenciclidina (PCP), y el MK-801 pueden prevenir las alteraciones conductuales y anatómicas producidas por el ácido kaínico en cerebro de rata (144), una buena parte de las estrategias terapéuticas probadas contra la neurotoxicidad del ácido quinolínico se ha dirigido hacia el empleo de antagonistas de los receptores para NMDA.

Destaca el efecto protector que ha demostrado tener el ácido kinurénico, antagonista competitivo de estos receptores relacionado metabólicamente al quinolínico, en hipocampo y cuerpo estriado de rata (145). Estos hallazgos tienen importancia por la implicación de los metabolitos de la vía de la kinurena en procesos de excitotoxicidad, así como el reporte reciente de que en la corea de Huntington, los niveles de ácido kinurénico en el cerebro disminuyen significativamente, lo que favorece la idea de

un vínculo directo de los receptores para NMDA en las alteraciones observadas en esta enfermedad (146). Adicionalmente, resulta interesante el antecedente referente a una tendencia genética de los cerebros de los enfermos coreícos a sintetizar un exceso de aminoácidos excitadores, entre los cuales, el mejor candidato es el ácido quinolínico (118).

El mejor tratamiento experimental probado hasta el momento contra la toxicidad del quinolínico, desde el punto de vista conductual, bioquímico y morfológico, es el MK-801, un antagonista no competitivo de los receptores para NMDA (147). A pesar de sus efectos benéficos ampliamente probados, el tratamiento crónico con este fármaco en animales lesionados con quinolínico produce una pérdida considerable de receptores dopaminérgicos tipo D-1, mostrando así, un marcado efecto tóxico secundario, por lo que la posibilidad de su aplicación terapéutica en pacientes con corea es controvertida (148). En un estudio comparativo in vivo realizado con varios posibles fármacos terapéuticos como pretratamientos en el modelo de la corea de Huntington, sólo el MK-801 previno completamente los efectos tóxicos del quinolínico (117). Los agentes antiperoxidantes de amplio espectro de acción (ascorbato, alopurinol, β -caroteno y α -tocoferol), los antagonistas competitivos del receptor para NMDA (ácido fosfonoalérgico (APV) y ácido fosfonoheptanóico (APH)), los bloqueadores de canales de calcio (nimodipina, nifedipina, nitrendipina y taurina, un

aminoácido que puede disminuir los niveles de calcio extracelular), así como los bloqueadores de la liberación de glutamato (baclofen), fueron probados sin éxito alguno. Sin embargo, la explicación a la carencia de efecto de algunas sustancias probadas anteriormente radica, según los autores, en su poca permeabilidad para cruzar la barrera hemato-encefálica (BBB), dado que su administración fué por vía sistémica. Los autores hacen notar que el esquema de administración empleado para los fármacos, así como las dosis usadas pueden no ser las adecuadas y puntualizan que el hecho de que los antioxidantes no mostraran efectos benéficos no implica que la posibilidad de un estrés oxidativo no se manifieste en este modelo experimental. Esto último se deriva del hecho de que a altas concentraciones, el alopurinol protegió parcialmente contra las alteraciones producidas por el quinolinico (117).

Finalmente, con el previo conocimiento de la existencia de un sitio activo de unión para zinc en el receptor para NMDA, y dado que el zinc puede inhibir la actividad de dichos receptores a bajas concentraciones, éste metal demostró ser efectivo en la protección contra los daños neuronales ultraestructurales inducidos por el quinolinico (149).

El estudio de los efectos de posibles agentes terapéuticos que eviten los daños provocados por esta toxina en sistema nervioso debe ser un campo en constante exploración en beneficio de las aplicaciones clínicas preventivas y curativas de la corea

de Huntington (150).

2.2.3. Mecanismos de neurotoxicidad del QUIN

El modelo de toxicidad del ácido quinolinico propuesto por Schwarcz y col. en 1984 (107), puede explicar en parte, la destrucción neuronal observada después de la administración intraestriatal de esta neurotoxina. En dicho modelo se aplica la teoría de la "excitotoxicidad" para explicar la acción tóxica del ácido quinolinico. La Figura 3 resume el mecanismo hipotético por el cual se pretende explicar la degeneración neuronal. Según este modelo, el ácido quinolinico puede actuar sobre receptores presinápticos específicos, induciendo la liberación de un posible transmisor endógeno que a su vez puede unirse a un receptor postsináptico del tipo NMDA en las neuronas "blanco", causando los procesos degenerativos. Adicionalmente, el ácido quinolinico puede unirse a receptores postsinápticos para NMDA. En este punto es interesante considerar la evidencia de que el ácido fosfoheptánico (APH) bloquea la neurotoxicidad del ácido quinolinico en los receptores postsinápticos para NMDA, mientras que la incapacidad del ácido kinurénico (KYNA) para antagonizar los efectos tóxicos del ácido iboténico (IBO) en los receptores postsinápticos para NMDA aunada a su capacidad para prevenir los eventos tóxicos del quinolinico, sugieren un bloqueo preferencial de los receptores presinápticos para quinolinato (107). Haciendo a un lado las diferencias en los mecanismos de toxicidad entre los ácidos kainico, iboténico y quinolinico, parece claro que el

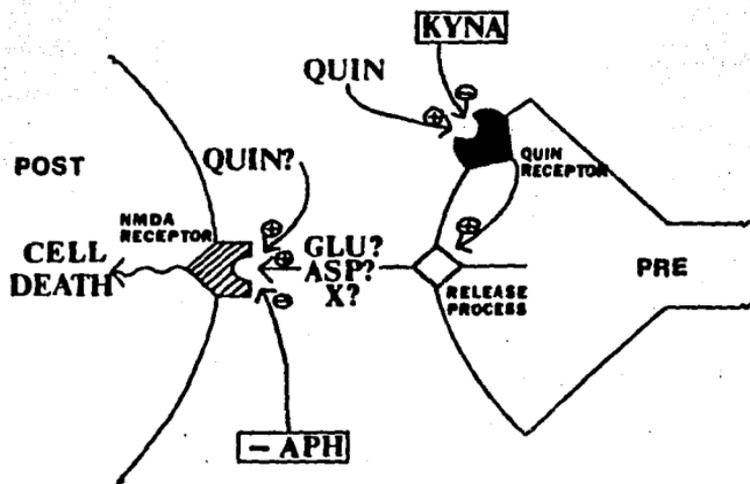


FIG. 3

Schematic diagram of hypothetical mechanisms involved in QUIN's excitotoxic actions. For explanations see text.

Tomado de Life Sciences Volumen 35 (Schwarcz, R. et al. 1984).

resultado final de la aplicación de las excitotoxinas es una activación de las neuronas y es posible que las células susceptibles sean simplemente "excitadas hasta la muerte". Los mecanismos iónicos de excitación no son del todo claros aún, pero se sabe que los canales para Ca^{++} y probablemente los canales para Na^+ estén involucrados. El calcio está vinculado con procesos de degeneración, convulsiones y muerte celular (107), por lo que su participación en el mecanismo de toxicidad del quinolínic juega un papel relevante que debe ser analizado detalladamente.

2.2.3.1. Excitotoxicidad y papel del calcio intracelular

Los mecanismos de transducción regulados por los receptores para aminoácidos excitadores (EAA) involucran la apertura de canales iónicos. Los canales asociados con los receptores para NMDA, quisqualato y kainato, son permeables para Na^+ y K^+ . Adicionalmente, se sabe que los receptores para NMDA son permeables para Ca^{++} . Existe evidencia de que la unión de EAA guarda más una estrecha relación con la actividad de la fosfolipasa C que con la adenilato ciclasa. Se sabe también que la activación de algunos receptores para EAA estimula la vía de segundos mensajeros de inositol fosfato/diacilglicerol (122).

Dos explicaciones alternativas han sido propuestas para explicar los mecanismos tóxicos vinculados con la sobre-activación de los receptores para NMDA, mediados por cambios en

la permeabilidad a diferentes iones:

a) La prolongada despolarización de las células inducida por EAA, introduce cloruros al citosol celular, modificando así el gradiente electroquímico. La entrada de cloruros resulta en una entrada posterior de cationes (como Ca^{++} y Na^{+}) para mantener la electroneutralidad, seguida por una entrada de moléculas de agua, las cuales conducen eventualmente a una citólisis (151).

b) El más aceptado mecanismo implicado en la activación de los receptores para NMDA consiste en la entrada masiva de iones calcio al interior de la célula por la apertura de canales asociados a estos receptores. La concentración normal de calcio en el citosol es de aproximadamente 100 nM, mientras que en el espacio extracelular esta concentración es 10,000 veces mayor. Los incrementos sostenidos de calcio citosólico tiene repercusiones severas en los procesos fisiológicos: activación de proteasas y lipasas, generación de radicales libres y alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial (152,153).

El calcio es un componente regulador en una amplia gama de procesos celulares. Muchas clases de protein-cinasas modulan su actividad por calcio, lo cual incluye un gran número de 3'5'-AMPC protein-cinasas (154).

Existen dos mecanismos básicos mediante los cuales la concentración intracelular de calcio puede incrementarse (154):

1) El calcio extracelular puede entrar a la célula a través de la membrana plasmática por canales de calcio específicos o por acarreadores del ión. Un gran número de canales de calcio han sido farmacológicamente identificados. La entrada de calcio puede además deberse a daño inespecífico en la membrana celular, dado que la integridad de esta membrana es vital para mantener los enormes gradientes de calcio extra e intracelular. Bajo circunstancias normales, la permeabilidad pasiva de la membrana al calcio es cuatro veces menor en magnitud que la de Na^+ ó K^+ .

2) Otra forma de incremento en los niveles intracelulares es por la liberación del ión almacenado en organelos celulares tales como la mitocondria o el retículo endoplásmico. Menos del 1 % del calcio intracelular está en forma libre, mientras que el resto se encuentra almacenado en membranas subcelulares y organelos. El daño a la mitocondria o segundos mensajeros como el inositol trifosfato, pueden liberar calcio desde los organelos hacia el citosol celular (154).

Niveles altos de calcio intracelular han sido correlacionados con daños celulares irreversibles, los cuales pueden deberse al rompimiento generalizado de la integridad celular o en la disminución de los procesos energéticos. El incremento en calcio puede ser acompañado de eventos tóxicos en células nerviosas sin ser necesariamente la causa de la muerte celular (155), pero si con cierta asociación con las convulsiones (155), daño en la médula espinal (156), la uremia

(157), la encefalopatía por aluminio (158), la intoxicación por plomo (159) y en la toxicidad del ácido kaínico (160).

Muchas rutas potenciales pueden ser activadas por el incremento en calcio intracelular. La activación excesiva de proteasas puede causar la degradación de proteínas, mientras que la activación de lipasas por calcio puede incrementar los niveles de ácidos grasos libres en respuesta a estrés oxidativo, además de alterar los procesos de transporte axoplásmico (154). El calcio puede además potenciar el daño oxidativo celular, y de manera inversa, varios agentes pro-oxidantes parecen incrementar los niveles de calcio citosólico (154). Los agentes antagonistas de calcio, tales como el Mg^{++} , Cd^{++} , y verapamil pueden prevenir la toxicidad de este ión. En presencia de agentes neurotóxicos y de organometales, la concentración de calcio citosólico aumenta drásticamente, pero no así la del ATP, lo cual sugiere que el sistema de producción de ATP mitocondrial no es el más afectado por los agentes neurotóxicos (161).

Finalmente, el calcio intracelular en concentraciones elevadas, como parte de su acción pro-oxidante en los lípidos de las membranas, puede activar nucleasas que conduzcan a la formación de productos de oxidación membranar de los grupos sulfhidrilo (-SH), y también dañar irreversiblemente al DNA celular (162).

2.2.4. El QUIN y los receptores para N-Metil-D-Aspartato (NMDA)

Se ha discutido con anterioridad la serie de eventos tóxicos que acompañan a la activación de los receptores para NMDA por la administración de quinolínico en diversas condiciones experimentales. Este proceso implica el incremento de los niveles citosólicos de calcio, lo cual conduce al daño celular irreversible y eventualmente, a la muerte celular. Este mecanismo puede resumirse de la siguiente forma:

ACTIVACION EXCESIVA DE LOS RECEPTORES PARA NMDA POR QUIN



INCREMENTO EN LA CONCENTRACION DE CALCIO CITOSOLICO



ACTIVACION DE PROCESOS PATOLOGICOS POR EL CALCIO



MUERTE CELULAR

Existen informes en los cuales se establece la relación entre la activación de los receptores para NMDA por varios EAA y el incremento en los niveles citoplásmicos del calcio en Sistema Nervioso (163). La relación entre la sobre-excitación inducida por el ácido quinolínico con incrementos citoplásmicos de calcio, mediados por la excitación de los receptores para NMDA también ha sido descrita ampliamente (155,164,165). El papel del ácido quinolínico como agonista de los receptores para NMDA (132) y su implicación directa con el incremento en calcio intracelular

(155) representan una alternativa para explicar las alteraciones morfológicas y bioquímicas del modelo de la corea de Huntington, descritas con anterioridad (166). El hecho de que el magnesio, el cual tiene un sitio inhibitor en el receptor para NMDA, inhiba la entrada de calcio al citosol mediada por el receptor, y prevenga la neurotoxicidad del glutamato y del quinolinato (167) sugiere la participación de este mecanismo, en donde la unión de excitotoxina con receptor, sea el paso inicial de los procesos de neurotoxicidad.

2.3. La peroxidación de lípidos como posible mecanismo neurotóxico del QUIN

Algunas evidencias experimentales hacen suponer que el ácido quinolínico pueda promover la peroxidación de lípidos por medio de la generación de radicales libres. Entre estas evidencias se encuentran las siguientes:

a) La implicación del calcio en la promoción de estrés oxidativo en Sistema Nervioso (168,169).

b) La evidencia de que otras neurotoxinas que producen modelos experimentales de múltiples enfermedades neurológicas, promueven procesos pro-oxidativos. Entre estas toxinas están el ácido kaínico (170,171), la 6-hidroxi dopamina (172), la MPTP y la MPP+ (173). Así mismo, el hecho de que otros agentes que son antagonistas de los receptores para NMDA (preferencialmente ketamina (174)), y varios bloqueadores tipo β de canales de

calcio (verapamil, propanolol, diltiazem, atenolol, metoprolol y flunarizina (175)) mediante la captura de radicales hidroxilo, prevengan la peroxidación de lípidos.

c) El reciente informe acerca de la existencia de un sitio modulador redox de la respuesta de los receptores para NMDA (175). Este sitio específico del complejo receptor NMDA-canal de calcio, es regulado por glutatión oxidado. Este resultado sugiere que la peroxidación de lípidos, en condiciones normales, podría estar jugando un papel activo en la regulación de los procesos fisiológicos asociados con la transducción de la señal mediada por los receptores para NMDA.

d) La existencia de un componente generador de radicales libres observado en estudios de activación de los receptores para NMDA por la aplicación de glutamato, el cual induce disminución en los niveles de glutatión reducido (176), así como el hallazgo de la generación de superóxido durante actividad electroconvulsiva en sinaptosomas relacionada a calcio (177,178), puntualizan la importancia de los procesos excitotóxicos en la generación de lipoperoxidación.

Estos resultados sugieren que el ácido quinolinico puede promover el estrés oxidativo en el cuerpo estriado mediante la apertura de canales de calcio en respuesta a la excitación de los receptores para NMDA.

2.3.1. Radicales libres y la peroxidación de lípidos

Un radical libre puede definirse como una especie química que tiene uno ó más electrones desapareados. Esta definición incluye a los átomos de hidrógeno, muchos metales de transición y la molécula de oxígeno misma (179).

La formación de radicales libres es un proceso que sucede normalmente en los sistemas vivos. Se ha observado que algunos organelos como la mitocondria y los microsomas, generan espontáneamente superóxido (O_2^-). Por su parte, tanto el fierro (en su forma oxidada Fe^{3+}) como el cobre (en su forma monovalente Cu^+) se encuentran normalmente en la dieta que consumimos. La reducción del fierro a su estado Fe^{2+} facilita su absorción. La ferritina, una proteína vital en la homeostasis del fierro, parece funcionar en la prevención de la acumulación excesiva del fierro libre, entrando a la proteína en su forma oxidada, y saliendo de ella en su forma reducida. Por su parte, el cobre puede ser almacenado en la ceruloplasmina, proteína que puede catalizar la oxidación de las poliaminas y los polifenoles, reducir al oxígeno en agua y oxidar al fierro a su forma Fe^{3+} . Aún cuando el fierro y el cobre son asimilados por las células y los organelos para desarrollar múltiples funciones fisiológicas (pinocitosis, para quelar citrato, ATP y GTP, incorporación en citocromos, funcionamiento de enzimas, etc.), generalmente no se encuentran en exceso, sino almacenados en sus respectivas proteínas (179).

Si existiera alguna descompensación en los niveles de alguno de estos metales, no es difícil imaginar la disponibilidad de ambos en procesos de oxidación. Si el H₂O₂, el cobre y el hierro están disponibles in vivo, como se ha demostrado, entonces los radicales .OH, así como el resto de los mencionados pueden llegar a formarse. Más aún, El hierro libre puede estar disponible en el medio para la reacción de Fenton, así como el cobre para formar .OH a partir de H₂O₂ (179), de acuerdo con la siguiente reacción (reacción de Fenton):



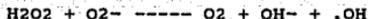
Las sales de cobre pueden reaccionar con H₂O₂ para formar radicales .OH de la siguiente manera:



Por otra parte, el papel tóxico del radical superóxido ha sido ampliamente estudiado. La enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual remueve al radical superóxido, es muy importante para la sobrevivencia de los animales bajo condiciones de incrementos drásticos en la concentración de oxígeno. Dada la especificidad de esta enzima sobre el superóxido como sustrato, se concluye que este radical debe ser una especie tóxica (179).

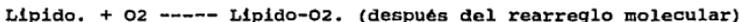
El interior de las membranas biológicas es hidrofóbico, y el oxígeno producido en este medio puede ser altamente dañino destruyendo fosfolípidos por ataque nucleofílico de los grupos

carbonilo de los enlaces éster, formando glicerol a partir de ácidos grasos. En estos procesos, la reacción de formación de radicales hidroxilo a partir de superóxido y H₂O₂, juega un papel básico:



Este proceso, conocido como reacción de Haber-Weiss, no ocurre en condiciones fisiológicas normales, en presencia de concentraciones bajas de oxígeno o de H₂O₂, pero se ha demostrado que esta reacción puede ocurrir si es catalizada por metales de transición.

La iniciación de la peroxidación de lípidos en una membrana o en ácidos grasos libres se debe al ataque de cualquier especie que sea suficientemente reactiva para abstraer un átomo de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente serie de reacciones. Dado que un átomo de hidrógeno tiene sólo un electrón, éste busca aparearse con uno del átomo de carbono. El radical carbón en los ácidos grasos poli-insaturados tiende a ser estabilizado por un rearrreglo molecular que produce dienos conjugados, los cuales reaccionan rápidamente con O₂ para dar un hidroperoxi-radical. Este extrae átomos de hidrógeno de otras moléculas lipídicas y así continúa la cadena de reacciones de lipoperoxidación. El hidroperoxi-radical se combina con el átomo de hidrógeno extraído para dar un hidroperóxido lipídico (179):

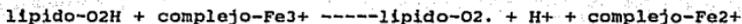




El fierro reducido de algunos compuestos puede reaccionar con hidroperóxidos lipídicos (lípido-O₂H) para dar alcoxirradicales (lípido-O.):



con un compuesto de Fe³⁺, un peroxi-radical (lípido-O₂.) puede formarse:



Tanto el alcoxí-radical como el peroxi-radical estimulan la cadena de reacciones de la peroxidación de lípidos por abstracción posterior de átomos de hidrógeno (179,180).

Los organismos tienen varios mecanismos de defensa antioxidante. Entre ellos destacan principalmente dos (181):

a) Las enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD, metaloenzima que cataliza la transformación de superóxido en peróxido de hidrógeno), catalasa (enzima que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno), la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (peroxidasa que cataliza la reducción de hidroperóxidos por glutatión) y otras peroxidases dependientes de glutatión (lacto y mieloperoxidasas), así como la metalotioneína dependiente de zinc (enzima que protege los grupos sulhidrilos de otras enzimas de

los ataque por radicales libres).

b) Atrapadores de radicales libres y antioxidantes: glutatión reducido (GSH, el cual actúa en conjunto con las glutatión transferasas, catalizando reacciones que involucran a los radicales libres, por lo que la cuantificación de sus niveles, cuando descienden, o de los niveles incrementados de glutatión oxidado (GSSG) representa un buen índice de la peroxidación), el ascorbato (vitamina C, reduce a los radicales libres y forma deshidroascorbato, por un mecanismo probablemente relacionado a GSH), tocoferoles como el α -tocoferol (vitamina E, que bloquea la cadena de reacciones oxidativas por selenio, aceptando los electrones desapareados de los radicales), β -caroteno (precursor de la vitamina A, reacciona directamente sobre los radicales libres, inactivándolos sinérgicamente con α -tocoferol), bilirrubina (derivada del catabolismo de hemoproteínas, actúa rompiendo la cadena oxidativa), entre otros.

Finalmente, el estrés oxidativo puede ser definido como un estado en el cual, la exposición a los radicales libres u otros oxidantes, inducen a cambios en las funciones normales, o en la sobrevivencia misma de las células (182).

2.3.2. Efectos de la peroxidación de lípidos en sistemas biológicos

Los componentes celulares principales (proteínas, lípidos membranales, ácidos nucleicos y matriz extracelular), tienen alto

riesgo de ser atacados por los radicales libres (181).

En las proteínas, los radicales libres producen modificación de los aminoácidos, fragmentación de la proteína y agregación de los segmentos de otras proteínas. Los aminoácidos más sensibles a los procesos oxidativos son el triptofano, la tirosina y la fenilalanina, así como la cistina y la cisteína, por su contenido de azufre. Especialmente los enlaces disulfuro de los grupos sulfhidrilo de algunas proteínas son susceptibles a los radicales libres (181).

Los enlaces insaturados de los lípidos membranales, como el colesterol, así como los ácidos grasos, pueden reaccionar con radicales libres y conducir a la peroxidación de lípidos. Como cada peróxido lipídico es un radical que puede reaccionar con más lípidos, la peroxidación se vuelve autocatalítica y puede involucrar a otros organelos cercanos. La peroxidación de lípidos altera la estructura y función de la membrana y puede producir la entrada de iones calcio y otros. Adicionalmente se ha demostrado que la peroxidación es un mecanismo de alteración de la afinidad de la ATPasa de Na^+ y K^+ por estos iones. La peroxidación está asociada con procesos de envejecimiento celular y está involucrada en neuropatologías como la hipoxia y la isquemia cerebrales (181).

Dada la estructura compartimentalizada en el núcleo celular de las moléculas de DNA y su estructura en forma de hélice, la

superficie de contacto del DNA con los radicales libres es mínima. La protección por las histonas contra los daños y un eficiente mecanismo de reparación confieren al DNA pocas posibilidades de ser afectado por estos radicales. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que los componentes orgánicos individuales del DNA (bases púricas y pirimidínicas) son sensibles a los radicales libres (183). El radical superóxido está involucrado en el rompimiento de la doble hélice del DNA (184). En cada cadena separada del DNA, otros radicales libres pueden estar actuando, modificando las bases de los ácidos nucleicos y de las cadenas azúcares-fosfato, resultando en una expresión genética aberrante que conduce a la muerte celular (185).

El sistema nervioso es especialmente susceptible a la peroxidación debido a: 1) la riqueza de las membranas de este tejido en cadenas de ácidos grasos poli-insaturados, 2) la pobre actividad de la catalasa y la moderada concentración de superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa en cerebro, y 3) el alto contenido de hierro en algunas regiones cerebrales, preferencialmente en ganglios basales, siendo este un ión necesario para procesos como la unión de neurotransmisores a sus receptores (186).

Toda esta gama de acciones a nivel molecular, confieren a los radicales libres una gran capacidad para producir severas alteraciones en diversas enfermedades, entre ellas destaca su

participación como agentes etiológicos en hipoxia, isquemia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, cancer, edema cerebral, enfermedades convulsivas, esquizofrenia, envejecimiento celular, etc. (179,181,186). La peroxidación de lípidos es un mecanismo involucrado en la inhibición de la recaptura de GABA en sinaptosomas (187), lo que da una idea del potencial neurotóxico que representa la peroxidación en el sistema nervioso.

2.3.3. El calcio y los eventos pro-oxidantes

El calcio parece jugar un papel importante en la liberación de radicales del oxígeno en muchas de las vías que han sido propuestas como predominantes para la producción de radicales en el cerebro. La entrada de calcio al citosol, así como su promoción por un ionóforo de calcio y la activación de proteinasa C, tienen efectos sinérgicos en la liberación de superóxido de las células endoteliales (188). Durante la isquemia, hay incrementos considerables de calcio intracelular que activa fosfolipasas y libera ácidos grasos libres como el ácido araquidónico, el cual es metabolizado mediante la lipooxigenasa y la ciclo-oxigenasa, con la consecuente producción de radicales libres y prostanoïdes vasoconstrictores. Adicionalmente, el calcio puede activar la proteasa calpaïna, la cual modifica una cadena peptídica de la xantina deshidrogenasa y la convierte en xantina oxidasa en los vasos sanguíneos cerebrales del endotelio. Un incremento en la actividad de la

xantina oxidasa puede contribuir a la generación de radicales libres (189), como resultado del incremento en el metabolismo de la vía de la xantina al ácido úrico.

Existen al menos dos mecanismos de activación de los radicales libres a partir de los leucocitos. Uno de ellos es un mecanismo dependiente de calcio y el otro no. En el endotelio, la entrada de calcio, así como la promoción del ionóforo de calcio en la activación de la protein-quinasa C, tienen efectos sinérgicos en la liberación de superóxido de los neutrófilos. De esta forma, existe una producción de radicales libres del oxígeno que es dependiente de calcio. A pesar de este conocimiento, el mecanismo por medio del cual la estimulación de los leucocitos por componentes complementarios y mediada por el calcio, se producen radicales libres después de isquemia cerebral, no se conoce con precisión (188).

Muchas de estas alteraciones ocurren por lipólisis y daño mitocondrial. Así pues, la relación entre los estados de excitotoxicidad y producción de radicales libres puede ser bidireccional: los radicales libres pueden potencialmente favorecer a la liberación excesiva de aminoácidos excitadores y, por otra parte, la liberación de EAA favorece la generación de radicales libres. La alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, mediada por calcio, puede incrementar las tasas de producción de radicales libres (189). De manera inversa, el daño mitocondrial iniciado por radicales libres puede disminuir la

efectividad de las bombas para calcio dependientes de energía, y de esta forma bloquear la capacidad de la membrana plasmática para excluir al calcio (189).

La evidencia de que bloqueadores de canales de calcio tipo B pueden inhibir la peroxidación de lípidos, atrapando radicales hidroxilo, sugiere un mecanismo de toxicidad del calcio implicado en la producción de dichos radicales (190), sin embargo, el hecho de que exista evidencia referente a la formación de un complejo interactivo entre calcio y el radical superóxido, promotor de peroxidación, también sugiere una implicación de dicho radical en los procesos tóxicos promovidos por el calcio (168).

Finalmente, el hecho de que el calcio se acumule en las terminales sinápticas como resultado del incremento en la edad, sugiere que este ión pueda estar implicado en la generación de procesos oxidativos tendientes al envejecimiento celular (169). La serie de eventos relacionados a la peroxidación que son mediados por el calcio, están representados en la Figura 4.

El creciente interés por el estudio del óxido nítrico (NO) en su participación en procesos de neurotoxicidad mediados por la activación de los receptores para NMDA, la entrada de iones calcio al citosol y el incremento en GMPC, representan una explicación adicional de estos procesos tóxicos (191), aunque la falta de estudios sobre estos procesos dependientes de calcio, no permiten hacer afirmaciones contundentes.

BONDY

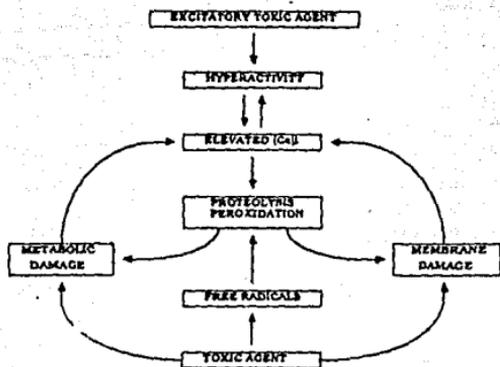


FIG. 4. Proposed means by which elevated $[Ca^{2+}]$, may mediate and exacerbate various forms of neurotoxic damage.

Tomado de Neurotoxicology and Teratology
Vol. 11. (Bondy C.S., 1989).

2.3.4. Evidencias de la promoción del estrés oxidativo inducido por el QUIN en cerebro de rata in vitro

En la literatura sólo existen dos reportes acerca de la posible relación entre el ácido quinolínico y el estrés oxidativo. El primero es un estudio acerca del efecto protector de un agente antiperoxidante, el idebon, sobre la neurotoxicidad de diferentes aminoácidos excitadores: el ácido kainico, el quisquálico y el quinolínico. El grado de protección fué determinado por análisis cuantitativos neuroquímico e histoquímico del cuerpo estriado, así como por la respuesta rotacional a la administración s.c. de apomorfina una semana después de la inyección unilateral de las diferentes neurotoxinas. Por los tres criterios, el tratamiento con idebon proteje significativamente contra la acción neurotóxica del ácido kainico y del quisquálico, pero no contra el quinolínico (192). En otros estudios, el idebon fué efectivo contra la neurotoxicidad del ácido kainico en cultivos de células cerebelosas, en una amplia gama de condiciones experimentales, reduciendo los niveles de radicales libres y actuando como atrapador de los mismos (193).

En un segundo estudio (194), sin embargo, se informa que el ácido quinolínico es un promotor de la peroxidación de lípidos in vitro. El ácido quinolínico promovió la formación de TBARS (un índice de la peroxidación de lípidos) a diferentes concentraciones y tiempos de incubación del tejido en presencia

de la toxina.

Este último estudio establece las bases para la realización del presente trabajo, que tiene como objetivo caracterizar los eventos oxidativos in vivo, inducidos por la sobre-activación selectiva de los receptores para NMDA por esta neurotoxina endógena (194).

2.4. Evaluación de la peroxidación de lípidos

Existe un gran número de técnicas para evaluar la tasa de peroxidación de las membranas lipídicas. Cada técnica mide índices diferentes y no existe un sólo método que por sí sólo sea totalmente confiable para tal efecto (195).

La oxidación de los lípidos puede ser medida a diferentes niveles: a) pérdida de ácidos grasos insaturados, b) medición de los productos primarios de la peroxidación y c) la evaluación de carbonilos secundarios y gases de hidrocarburos (162).

La composición química de los productos terminales de la peroxidación depende de la composición de los ácidos grasos del sustrato lipídico analizado y de los metales presentes. Los iones cobre y hierro generan diferentes productos terminales. Los iones cobre son buenos estimuladores de la peroxidación en lipoproteínas de baja densidad, pero no en microsomas, por lo que la evaluación de la peroxidación por un sólo método puede dar resultados subjetivos (162). Las sales de cobre que descomponen eficientemente los peróxidos, generan bajas concentraciones de

peróxidos detectables, pero altos niveles de carbonilos, los cuales pueden reaccionar posteriormente con moléculas que contienen grupos amino para formar productos fluorescentes (162).

2.4.1. El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA)

El ensayo del TBA es uno de los más antiguos y más frecuentemente usados para la evaluación de la peroxidación de los ácidos grasos, en membranas y productos alimenticios. Es un método sencillo y puede ser aplicado a sistemas biológicos en fresco (195). Un cromógeno es formado por la reacción de una molécula de malondialdehído (MDA) con dos moléculas de TBA. Algunos otros aldehídos formados en sistemas lipoperoxidantes pueden generar diferentes cromógenos con el TBA, tales como biliverdina, glioxal, furfuraldehído y etanal + sacarosa, los cuales también pueden ser detectados a una absorbancia de 532 nm (162). El complejo (TBA)₂-MDA puede ser separado de estos otros cromógenos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) (196). Algo del MDA detectado por esta prueba se forma durante el proceso de la peroxidación por sí sólo, pero una gran cantidad se genera por la descomposición de los peróxidos lipídicos durante la etapa de incubación ácida de la prueba (proceso acelerado por la presencia de los iones metálicos presentes en el TBA, en los ácidos y en las sustancias a probar). Sin embargo, la reciente corrección de este método por la aplicación de hidroxitolueno butilado (BHT, un antiperoxidante que bloquea la degradación de los hidroperóxidos lipídicos) y de

desferrioxamina (DFO, un inhibidor de la formación de productos de la peroxidación catalizados por fierro) a los sistemas biológicos a evaluar antes de su incubación con TBA (197), le confiere a esta prueba una mayor confiabilidad. Dado que el ensayo del TBA no mide solamente los niveles de MDA, el término TBARS (sustancias reactivas al TBA) es más adecuado.

2.4.2. El ensayo de los productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación

Los pigmentos fluorescentes parcialmente derivados de los lípidos se acumulan en los tejidos en función de la edad (195). Estas sustancias también llamadas "pigmentos de la edad" son complejos de productos de la oxidación de los lípidos con proteínas. La reacción de los compuestos carbonilos, tales como el malondialdehído, con proteínas de cadenas laterales de grupos amino, aminoácidos libres ó con bases de ácidos nucleicos, producen sustancias conocidas como bases de Schiff (195).

El malondialdehído, con dos grupos carbonilo, puede reaccionar con dos compuestos amino para producir moléculas fluorescentes cuya fórmula general es $R_1-N=CH-CH=CH-NH-R_2$, donde R_1 y R_2 son los compuestos unidos a los grupos amino. Estos productos, llamados bases de Schiff-aminoiminopropeno, son precursores de los pigmentos de la edad. Dichas bases de Schiff pueden ser fácilmente extraídas de los sistemas biológicos para su análisis (195). La fluorescencia es un método altamente

sensible para evaluar la peroxidación y correlacionarla con los otros métodos, aún cuando representa una forma de medición de los procesos oxidativos de las últimas etapas. La longitud de onda exacta a la cual los productos fluorescen depende de la naturaleza de las cadenas laterales R1 y R2 (195). La fosfatidiletanolamina y la cercanamente relacionada fosfatidilserina, tienen ambos grupos amino libres y pueden reaccionar con los carbonilos para dar productos fluorescentes (195).

Una propiedad común de los aldehídos es su capacidad de polimerización, uniéndose varias moléculas para formar una de mayor tamaño, lo cual puede ocurrir con el malondialdehído, siendo sus productos poliméricos fluorescentes. La auto-oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados pueden desarrollar fluorescencia, aún cuando no existan grupos amino cercanos, lo cual puede deberse a los polímeros del malondialdehído y otros aldehídos (195). Los productos lipídicos de la peroxidación pueden ser obtenidos por solubilización en una fase de cloroformo-metanol. Productos como la lipofuscina, 1-amino-3-iminopropeno (base fluorescente de Schiff) y otros cromóforos fluorescentes, pueden ser detectados a longitudes de onda similares (370 nm de excitación y 430 nm de emisión) (198).

2.4.3. Otros métodos de evaluación

De la gran variedad de métodos para medir la tasa de

peroxidación en sistemas biológicos, algunos son más adecuados para los experimentos in vitro, dependiendo de los productos terminales de la peroxidación y del mecanismo por medio del cual se induzca. Explicar y detallar cada uno de ellos sería motivo para un trabajo más extenso, por lo que a continuación se hace una mención general de los métodos más empleados, los productos que miden y, a grandes rasgos, como se realizan (162):

a) Análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases o cromatografía de líquidos: evalúa la pérdida de ácidos grasos insaturados, empleada para evaluar la lipoperoxidación inducida por metales.

b) Electrodo de oxígeno: mide la captura de oxígeno por radicales de estructura de carbón centrado durante las reacciones de descomposición del peróxido, no es muy sensible y se usa in vitro cuando hay interferencia espectrofotométrica o por agentes tóxicos.

c) Degradación de peróxidos separados previamente por CLAR: evalúa peróxidos lipídicos, se emplea bajo la base de que muchas proteínas descomponen los peróxidos lipídicos y forman productos inmediatos.

d) Glutación peroxidasa (GSPasa): mide peróxidos lipídicos, se emplea dado que la GSPasa reacciona con H₂O₂ e hidroperóxido, oxidando glutación reducido (GSH) a glutación oxidado (GSSG). Es un método adecuado y sensible para experimentos in vivo.

e) Niveles de GSH y GSSG por técnicas cromatográficas: es un buen índice de daño inducido por radicales libres in vivo cuando se observa disminución en GSH ó aumento en GSSG.

f) Ciclo-oxigenasa: evalúa peróxidos lipídicos pues la estimulación de la actividad de esta enzima sirve para medir las concentraciones de peróxidos en fluidos biológicos, correlacionándolas con sus efectos biológicos. Es muy sensible.

g) Gases de hidrocarburos: mide pentano y etano que se forman durante la descomposición de peróxidos lipídicos mediante cromatografía de gases. Es adecuada para la evaluación en experimentos in vivo.

h) Conjugación de dienos: mide estructuras de dienos conjugados por oxidación de ácidos grasos insaturados acompañada de un incremento en la absorbancia a la luz UV, pero requiere técnicas de separación o de extracción para su empleo en sistemas biológicos.

Otras técnicas no mencionadas, pueden representar estrategias considerables en la evaluación de la peroxidación de lípidos y en el monitoreo de sus productos. Para su selección, debe considerarse que es lo que se desea evaluar y como se genera la peroxidación. Siempre es recomendable el empleo de dos ó más técnicas de evaluación simultáneas para la mejor caracterización de los eventos pro-oxidantes (195).

2.5. Relación entre la peroxidación de lípidos y la corea de Huntington

Hasta el momento no existen evidencias directas de estrés oxidativo en el sistema nervioso de enfermos con corea de Huntington, siendo ésta, un área de investigación inexplorada. Sin embargo, en otras enfermedades neurológicas (Parkinson, Alzheimer, Wilson, isquemia, edema, epilepsias, esquizofrenia, envejecimiento celular, traumatismo, etc), ha sido caracterizada una participación activa de los procesos oxidativos originados por los radicales libres (181,186).

Deben ser considerados tres reportes indirectos aislados, que vinculan las alteraciones observadas en la corea de Huntington con los eventos peroxidativos, deben ser considerados:

a) El incremento en lipopigmentos, tales como la lipofuscina, en cerebros de pacientes con corea de Huntington postmortem (21), pueden ser relacionados con la degradación de los lípidos insaturados celulares y al envejecimiento neuronal. La lipofuscina, como otros lipopigmentos fluorescentes, es un compuesto que se acumula en una gran variedad de tejidos (199), en respuesta a procesos de envejecimiento celular, y está relacionada a procesos de degradación peroxidativa de los lípidos intracelulares (200,201,202,203).

b) En un estudio reciente (37), se observaron alteraciones en los niveles de fierro y cobre en ganglios basales de cerebros

de enfermos con corea de Huntington postmortem.

El incremento en cobre puede conducir a eventos oxidantes, como en la enfermedad de Wilson (204,205). Como se sabe, el cobre en forma de sales, reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar radicales hidroxilo (179), estando ambos disponibles in vivo.

c) Se ha demostrado que la administración tópica de aminoácidos excitadores (Ácido quinolinico, kainico, iboténico y quisquálico) en diferentes regiones de los ganglios basales de ratas inducen a una acumulación significativa en los niveles de fierro (evaluados por técnicas histoquímicas) (206), mediada, presumiblemente, por su liberación en condiciones fisiológicas, desde las células GABAérgicas (207). Este hallazgo es más interesante cuando se considera la evidencia existente del papel del fierro como agente pro-convulsivante y epileptogénico en condiciones experimentales (208) y asociado epilepsia post-traumática (209), en la cual se ha detectado un notable incremento de este metal. El fierro es liberado por la hemoglobina y la transferrina en hemorragias cerebrales y formación de hematomas (209), induciendo a la creación de focos epilépticos e implicando su participación en la generación de eventos de excitotoxicidad como resultado de las alteraciones celulares que produce.

Lo anterior sugiere un papel activo de los radicales libres

y de los eventos oxidativos en las alteraciones patológicas observadas en la corea de Huntington.

3. OBJETIVOS

- EVALUAR EL POSIBLE EFECTO PROMOTOR DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS INDUCIDO POR LA ADMINISTRACION IN VIVO DE ACIDO QUINOLINICO (QUIN) EN EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA, COMO MECANISMO DE DAÑO NEURONAL EN UN MODELO DE LA COREA DE HUNTINGTON.
- ESTUDIAR EL CURSO TEMPORAL DEL EFECTO LIPOPEROXIDATIVO DEL ACIDO QUINOLINICO IN VIVO EN EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA.
- ANALIZAR LA DOSIS DEPENDENCIA DEL EFECTO LIPOPEROXIDATIVO DEL ACIDO QUINOLINICO IN VIVO EN EL CUERPO ESTRIADO DE RATA.
- EVALUAR LA POSIBLE PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES PARA AMINOACIDOS EXCITADORES SUBTIPO NMDA, COMO MEDIADORES EN EL PROCESO DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS IN VIVO INDUCIDA POR ACIDO QUINOLINICO.
- COMPARAR EL EFECTO DEL ACIDO QUINOLINICO EN LA PEROXIDACION DE LIPIDOS CON EL EFECTO PRODUCIDO POR OTROS AGENTES EXCITOTOXICOS.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

4. HIPOTESIS

- El ácido quinolínico debe ser un agente promotor de la peroxidación de lípidos, generador de radicales libres y de un consecuente estrés oxidativo en cuerpo estriado de rata, en experimentos in vivo, por la mediación de procesos excitotóxicos producidos sobre los receptores para N-Metil-D-Aspartato (NMDA).

- Se espera que los tiempos a los cuales la peroxidación de lípidos sea máxima, después de la administración de QUIN, deben oscilar entre 60 y 120 minutos, lo que permitiría establecer a la peroxidación como un proceso tóxico adicional a la potencia excitadora del QUIN y no solamente un proceso que fuese el resultado de la muerte celular después de tiempos largos de exposición a la toxina.

- De acuerdo a reportes previos (210,211), se espera que los niveles de peroxidación de lípidos monitoreados en este trabajo guarden una relación farmacológica directamente proporcional a la concentración de la toxina (QUIN) administrada, siendo mayores a medida que se incrementa la concentración del QUIN en el cuerpo estriado.

- La manipulación farmacológica de los receptores para NMDA mediante la administración de un antagonista específico debe tener un efecto directo sobre los niveles de peroxidación monitoreados. Es de esperarse el bloqueo parcial o total de dicho efecto tóxico sobre la neurona, en presencia del QUIN.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Todo el desarrollo experimental, tanto en lo referente a la obtención de material, como en la aplicación de técnicas, se realizó en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez". S.S.A.

5.1. MATERIALES

5.1.1. Animales

Para todos los ensayos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 150-170 g., con una dieta estándar a base de Purina y agua disponible ad libitum, con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, a temperatura ambiente. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del I.N.N.YN. y mantenidos en cajas transparentes en grupos de 5.

5.1.2. Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron obtenidos de marcas comerciales. En la preparación de las soluciones se empleó agua desionizada obtenida de un purificador (Milli R/Q System, Millipore). Las soluciones fueron preparadas en frío, en agitadores magnéticos, y preservadas en refrigeración, protegidas de la luz.

Se prepararon soluciones stock de Acido Quinolínico (QUIN, 120, 240 y 480 mM), Acido Kainico (KA, 100 mM) y Sulfato Ferroso (FeSO_4 , 100 mM) obtenidos de SIGMA, así como de dizolcipina (MK-801, 1.5 mg/ml) obtenida de RBI. Tanto el QUIN como el KA fueron

disueltos en una solución 0.1 M de fosfatos (potasio dihidrógeno fosfato) + 0.9 % de NaCl, y llevados a un pH de 7.4 con una solución 0.1 N de NaOH (MERCK). Esta misma solución de NaCl y buffer de fosfatos, al mismo pH (sol. SBF, salina-buffer de fosfatos), sirvió como solución control en la microinyección intraestriatal. Bajo estas condiciones, dichas soluciones tienen una duración aproximada de 2 semanas. La solución de Sulfato Ferroso en agua fué preparada "en fresco" justo antes de ser utilizada en cada ensayo.

Para la evaluación de la peroxidación de lípidos por el ensayo del Acido Tiobarbitrico, el stock de TCA-TBA-HCl se preparó de acuerdo a las indicaciones de Wilbur, K.M. y colaboradores (213), como sigue: 16 % p/v de Acido Tricloroacético (TCA) obtenido de MERCK, 0.5 % p/v de Acido Tiobarbitrico (TBA) de SIGMA, y 0.25 N de Acido Clorhidrico (HCl) de MERCK. La solución es calentada durante 5-10 minutos con agitación magnética para favorecer la disolución de los reactivos. Posteriormente, se deja reposar hasta que enfrie. En estas condiciones, el reactivo tiene una duración media de 8 días.

Adicionalmente, se preparó una solución de desferrioxamina (DFO, 1.5 mM en agua, SIGMA), así como una solución de hidroxitolueno butilado (BHT, 3.75 % p/v en etanol-agua 50-50 %, SIGMA); ambas con una duración de 15 días.

Los reactivos para la determinación de proteínas por el

método de Lowry, O.H. y colaboradores (214), fueron: a) solución de Albúmina de Bovino (250 ug/ml) de SIGMA, con duración media de una semana, b) mezcla "en fresco" de: 49 ml de Na₂CO₃ (MERCK) al 2 % en NaOH (MERCK) 0.1 N + 0.5 ml de Tartrato de Na⁺ y K⁺ (MERCK) al 2 % en agua + 0.5 ml de CuSO₄ (MERCK) al 1 % en agua, cada solución con duración de 1 mes y c) Reactivo de FOLIN-FENOL (SIGMA) diluido 1:1 (v/v) y preparado "en fresco".

Para la evaluación de los productos fluorescentes de la peroxidación de acuerdo con la técnica empleada por Triggs, J.W. y Willmore J.L. (198), se preparó una mezcla "en fresco" de cloroformo-metanol en proporción 2:1 (ambos reactivos obtenidos de Baker Analyzed). Adicionalmente, se preparó una solución stock de 0.1 ug/ml de Quinina (MERCK) como estándar de fluorescencia, en 100 ml de una solución acuosa previamente preparada de Acido Sulfúrico (H₂SO₄, 0.05 M) de MERCK. Este estándar tiene una duración aproximada de 5 días.

Para los ensayos de evaluación de la conducta de acuerdo con el método empleado por Norman, B. y colaboradores (212), se preparó una solución de Apomorfina (SIGMA, 15 mg/100 ml) en agua, cuya duración aproximada en refrigeración es de 2 semanas.

5.2. METODOS

5.2.1. Administración estereotáxica de ácido quinolínico

Los animales se inyectaron intraperitonealmente una hora

antes de la microinyección con solución salina (NaCl 0.9 %, 1 ml/kg) o bien, con MK-801 (10 mg/kg) y posteriormente se anestesiaron 15 minutos antes del proceso quirúrgico con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) y fueron colocados en un aparato estereotáxico estándar. La piel sobre la cabeza del animal fué separada y el cráneo expuesto. Posteriormente, se hizo una incisión de aproximadamente 0.5 mm de diámetro, 0.5 mm anterior y 2.6 mm lateral al bregma (coordenadas de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos, G. y Watson, C. (215)). La microjeringa fué introducida a 4.5 mm de profundidad de la dura (215) para realizar la microinyección en la región del caudado-putamen del cuerpo estriado derecho. Este sistema es esquematizado en la Figura 5. Una vez que la jeringa estuvo en dicha región, se procedió a la microinyección de 1 ul de la solución SBF, o del ácido quinolínico (120 nmol/ul, 240 nmol/ul o 480 nmol/ul) o bien, de los diferentes fármacos empleados como referencia (ácido kainico 100 nmol/ul o FeSO₄ 100 nmol/ul). La administración se realizó en un periodo de dos minutos y posteriormente, se esperó otros dos minutos para su adecuada difusión en el tejido. La herida sobre la cabeza fué suturada y una vez cerrada, recibió una administración superficial de Garamicina. El animal fué colocado entonces en una caja individual para su recuperación con una fuente de calor.

5.2.2. Disección y obtención de estriados a tiempos variables

A tiempos variables después de la administración del ácido

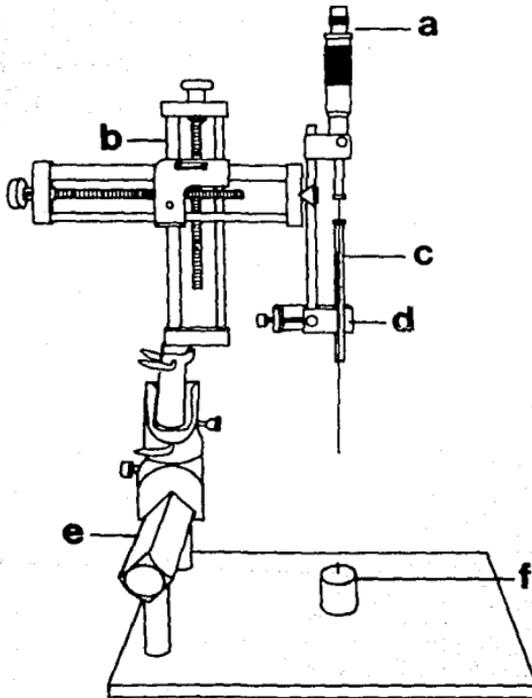


FIG. 5

Sistema de Microinyección: a) micrómetro; b) Torre estereotáxica; c) microjeringa de 10 μ l; d) sujetador de microjeringa; e) barra estereotáxica; f) "cero" estereotáxico.

quinolínico, Ácido kainico o FeSO_4 (15, 30, 60 o 120 minutos, 24 horas o 7 días), los animales fueron decapitados y sus estriados inmediatamente disecados, obteniendo el cuerpo estriado del hemisferio derecho (estriado inyectado). Este procedimiento fue realizado en el menor tiempo posible (2-3 minutos) sobre hielo. Los estriados fueron pesados y homogenizados en 1 ml (para los ensayos de peroxidación por el reactivo del ácido tiobarbitúrico) o en 3 ml (para los ensayos de los productos lipídicos fluorescentes) de solución salina (NaCl 0.9%) durante 30 segundos.

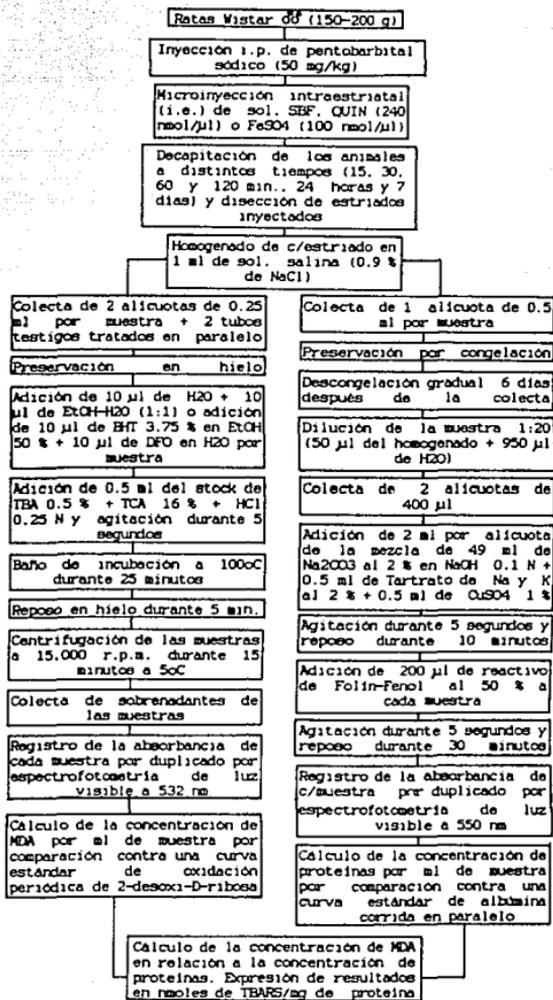
5.2.3. El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA)

A partir de 1 ml del homogenado, se tomaron dos alícuotas de 0.25 ml colectadas en tubos de plástico con capacidad para 1 ml y mantenidas en hielo. La alícuota restante de 0.5 ml fue almacenada y preservada en congelación para la posterior evaluación del contenido de proteínas. Dos tubos adicionales, con un contenido de 0.25 ml de agua desionizada cada uno, son destinados como tubos-blanco o testigos experimentales de peroxidación. A cada alícuota le fue añadido un volumen de 10 ul de BHT + 10 ul de DFO (para los ensayos de peroxidación por la técnica corregida empleada por Braughler, M.J. y colaboradores (197)) o bien, 20 ul de etanol- H_2O (50-50 %) + 20 ul de H_2O . Las alícuotas fueron agitadas suavemente para posteriormente recibir cada una un volumen de 0.5 ml de la solución stock de TCA (16 %) -TBA (0.5 %) -HCl (0.25 N). Los tubos fueron sellados y sometidos

a un baño de incubación a 100°C durante 25 minutos, al término del cual, las muestras fueron depositadas en hielo durante 5 minutos y centrifugadas a 15,000 r.p.m. durante 15 minutos a 5°C. El sobrenadante de cada muestra (cromógeno rosado) fué obtenido y depositado en celdas de cuarzo de un volumen de 1 ml. La absorbancia de las muestras fué determinada a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro de luz U.V.-Visible Beckman DU-6. La absorbancia detectada para los tubos-testigo fué descontada de los valores de absorbancia de las muestras. Con estos datos es posible, mediante interpolación sobre una curva estándar construida por oxidación periódica de concentraciones conocidas de 2-desoxi-D-ribosa (descrita por Waravdekar, V.S. y Saslaw, L.D. (216)), obtener la concentración de Malondialdehído (MDA), expresada en nmoles de TBARS/ml de muestra producida en cada condición experimental. La representación gráfica de este procedimiento puede observarse en la Figura 6A.

El contenido de proteínas se analizó por el método de Lowry, O.H. y colaboradores (214) de la siguiente manera: las alícuotas fueron descongeladas y un volumen de 50 μ l de cada una de éstas fué llevado a 1000 μ l con agua desionizada (dilución 1:20). A 400 μ l de cada dilución se añadieron 2 ml de la mezcla de 49 ml de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N + 0.5 ml de tartrato de Na y K al 2 % + 0.5 ml de CuSO_4 al 1 %. Cada muestra, analizada por duplicado, fué agitada durante 5 segundos y puesta en reposo. Diez minutos después, se agregó a cada tubo 0.2 ml del reactivo de Folin-Fenol

FIG. 6A. TÉCNICA DE EVALUACION DE LAS SUSTANCIAS REACTIVAS AL TBA (TBARS)



diluido previamente en agua en proporción 1:1 (5 ml del reactivo + 5 ml de agua desionizada) y nuevamente las muestras fueron agitadas durante 5 segundos. Treinta minutos después, la absorbancia del cromógeno azul formado en las muestras fué evaluada en el espectrofotómetro de luz U.V.-Visible a una longitud de onda de 550 nm. Para obtener la concentración de proteínas de las alicuotas a partir de los valores de absorbancia, se interpolan los valores sobre una curva estándar construida mediante concentraciones conocidas de albúmina de bovino.

5.2.4. El ensayo de evaluación de productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación

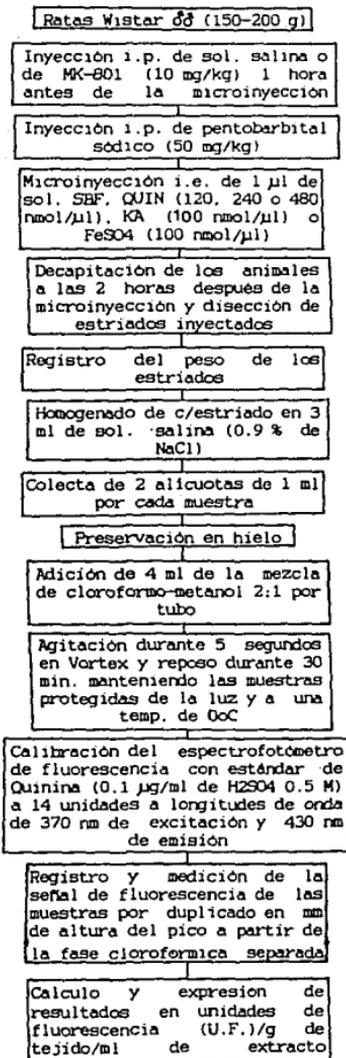
Para este ensayo, a partir de 3 ml del homogenado de tejido de cada muestra, se tomaron dos alicuotas de 1 ml cada una, colectadas en tubos de vidrio, adicionándoles 4 ml de la mezcla de cloroformo-metanol (2:1). Posteriormente, los tubos fueron agitados durante 5 segundos en Vortex y puestos en reposo sobre hielo, protegidos de la luz por 30 minutos. Al término de los 30 minutos de reposo de las muestras, la fase superior de cada tubo fué succionada mediante una bomba de vacío, cuidando de no mezclar las fases nuevamente. Una vez limpia la fase clorofórmica, se extrajo 1 ml de la muestra de cada tubo, se depositó en una celda de vidrio añadiéndole 100 μ l de metanol, y se agitó suavemente por 5 segundos. Inmediatamente después, la señal fluorescente de la muestra fué registrada por duplicado, en

un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer MPF-44A previamente ajustado a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 430 nm, y calibrado a 14 unidades de fluorescencia con una solución estándar de 0.1 ug de quinina/ml de H₂SO₄. Finalmente, se midió la altura (en mm) de los picos (señal de fluorescencia) registrados por el graficador, se realizó la corrección de las unidades de fluorescencia (mm de altura de la señal) por gramo de tejido previamente pesado y los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia/gramo de tejido húmedo/ml de extracto. Este procedimiento se encuentra representado gráficamente en la Figura 6B.

5.2.5. Evaluación conductual de la toxicidad del QUIN por la técnica de administración de apomorfina

Las ratas empleadas para esta parte experimental fueron administradas i.p. con solución salina (NaCl 0.9 %, 1 ml/kg) o MK-801 (10 mg/kg) una hora antes de la microinyección de QUIN o de la solución SBF, como ya se describió con anterioridad. La conducta de giro o rotación en estos animales fué evaluada 6 días después de la administración de la toxina como una forma de verificar la existencia de una lesión en el cuerpo estriado por la acción del QUIN, así como de la capacidad del MK-801 para prevenir los daños provocados por la toxina. Al sexto día de recuperación de los animales, éstos fueron administrados con una solución de apomorfina (1 mg/kg, s.c.) y colocados individualmente en una caja para su observación. Durante una

FIG. 6B. TÉCNICA DE EVALUACION DE LOS PRODUCTOS LIPIDICOS FLUORESCENTES

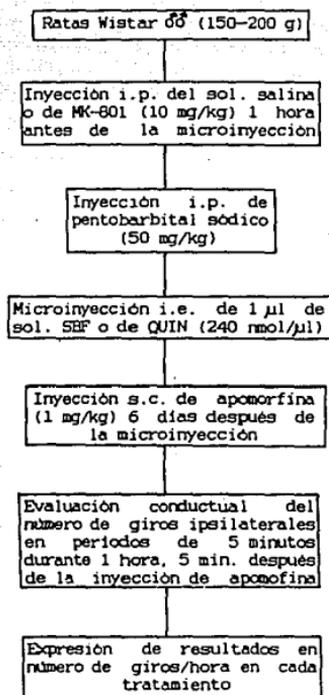


hora, la conducta de rotación de los animales fué evaluada por conteo visual del número de giros completos (giros de 360°) ipsilaterales al lado lesionado en periodos continuos de 5 minutos. Los resultados fueron expresados como número de giros/hora en presencia o en ausencia de MK-801 en los animales tratados con el QUIN. En la Figura 6C, se resume de manera gráfica la secuencia de pasos de la metodología empleada para estos experimentos.

5.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados, se realizó mediante la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas de hipótesis. Para estos estudios se empleó un análisis de varianza de diseño completamente aleatorizado con experimentos independientes. Las variables analizadas son del tipo numérico continuo, con excepción de la evaluación conductual, en donde se trata de una variable numérica discreta.

FIG. 6C. TÉCNICA DE EVALUACION DE LA CONDUCTA DE ROTACION

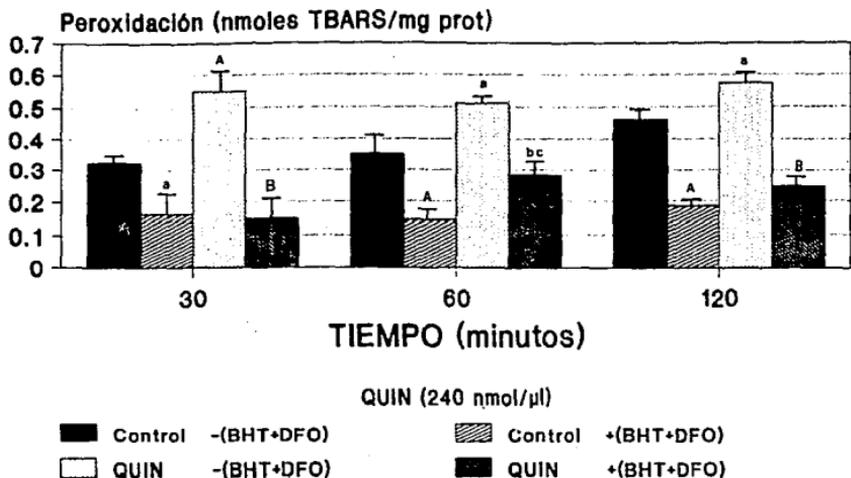


6. R E S U L T A D O S

6.1. Efecto del QUIN en la peroxidación de lípidos en cuerpo estriado a diferentes tiempos después de su administración por la técnica del TBA

En la Figura 7 se encuentran representados los resultados obtenidos de la aplicación de la técnica del TBA sin adición de hidroxitolueno butilado (BHT) ni desferrioxamina (DFO), así como en presencia de ambos agentes antioxidantes en los homogenados. En esta gráfica se observan las diferencias entre la técnica original y la técnica corregida del TBA. Las barras representan los promedios \pm el error estándar de 5 a 8 experimentos independientes por lote experimental. A los 30 minutos la peroxidación producida por el lote control sin BHT+DFO (0.324 ± 0.013 nmoles de TBARS/mg prot) fué mayor a la producida por el lote control con BHT+DFO (0.164 ± 0.029). Dicha diferencia fué estadísticamente significativa al aplicar la prueba de Tukey, como lo fueron también los niveles de peroxidación inducidos por el QUIN sin BHT+DFO (0.549 ± 0.043) en comparación con los producidos por el lote control sin BHT+DFO. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la peroxidación producida por el lote de QUIN sin BHT+DFO con la producida por el lote de QUIN con BHT+DFO (0.148 ± 0.039), siendo el valor de este último lote menor que el del primero. A los 60 minutos se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de peroxidación

FIGURA 7. EFECTO PRO-OXIDANTE DEL ACIDO QUINOLINICO IN VIVO EN CUERPO ESTRIADO DE RATA



PRUEBA DE TUKEY

a. + de QUIN-(BHT+DFO) y de Control+(BHT+DFO) vs C-(BHT+DFO) a p<0.05
 A. + de // y de // vs // a p<0.01
 b. + de QUIN+(BHT+DFO) vs QUIN-(BHT+DFO) a p<0.05
 B. + de // vs // a p<0.01
 c. + de QUIN+(BHT+DFO) vs Control+(BHT+DFO) a p<0.05
 C. + de // vs // a p<0.01

n=5-8 ratas

$\bar{x} \pm S.E.M.$

producidos por el lote control con BHT+DFO (0.144 ± 0.026) y los producidos por el lote control sin BHT+DFO (0.350 ± 0.041), siendo estos últimos mayores a los del primer lote. También se encontraron diferencias significativas entre el lote tratado con QUIN sin BHT+DFO (0.511 ± 0.016) y el lote control sin BHT+DFO siendo mayor la peroxidación en el primer lote. Entre el lote tratado con QUIN con BHT+DFO (0.281 ± 0.029) y el tratado con QUIN sin BHT+DFO hubo diferencias significativas, siendo notablemente menores los niveles de TBARS producidos en el primer caso. Este mismo lote tratado con QUIN en presencia de BHT+DFO, al ser comparado contra el control con BHT+DFO, mostró diferencias significativas, favoreciendo la producción de TBARS. Finalmente, a los 120 minutos se observó una menor promoción del proceso de la lipoperoxidación por parte del lote control con BHT+DFO (0.184 ± 0.002) y una mayor promoción de dicho proceso por parte del lote tratado con QUIN sin BHT+DFO (0.573 ± 0.021) en comparación con el lote control sin BHT+DFO (0.461 ± 0.018). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. El lote tratado con QUIN en presencia de BHT+DFO (0.244 ± 0.022) también difirió estadísticamente del lote control con BHT+DFO siendo mayor la peroxidación en el primer lote. Estos datos resumen los resultados comparativos entre ambas técnicas en el curso temporal de la peroxidación de lípidos producida por el QUIN a 3 distintos tiempos. En el curso temporal de la peroxidación de lípidos evaluado en estos ensayos, el tiempo en el cual el QUIN con BHT+DFO produjo el mayor nivel de TBARS fué a los 60 minutos,

mientras que el tiempo de mayor producción de TBARS para el tratamiento de QUIN sin BHT+DFO fué a los 120 minutos.

Se evaluó el curso temporal de la peroxidación de lípidos producida por el QUIN (240 nmol/ul) a 4 distintos tiempos (30, 60 y 120 min. y 24 horas) después de su administración unilateral en el cuerpo estriado de los animales. Con el fin de validar la técnica empleada, se realizó la evaluación de la peroxidación promovida por la microinyección de un agente peroxidante (Fierro en forma de $FeSO_4$). Los resultados de estos experimentos se encuentran resumidos en el Cuadro II. Los niveles de TBARS/mg de prot. producidos por el QUIN fueron estadísticamente significativos (prueba de Dunnett) a los 60 y 120 minutos al ser comparados con los producidos por el tratamiento control, mientras que los niveles de TBARS/mg prot. producidos por el Fe^{++} fueron estadísticamente significativos a los 4 tiempos evaluados. El tiempo al cual el QUIN promueve el máximo nivel de formación de TBARS es a los 60 minutos, mientras que para el Fierro, los 120 minutos representan el tiempo de máxima promoción de la peroxidación. Los 30 minutos y las 24 horas marcan el inicio y el fin, respectivamente, de los procesos pro-oxidantes promovidos por el QUIN en este sistema experimental. En el mismo Cuadro se expresan los porcentajes de peroxidación de los tratamientos experimentales de QUIN y de $FeSO_4$ vs. los tratamientos control en cada tiempo. Estos porcentajes son congruentes con la tasa de producción de TBARS al ser comparada con los valores control. El

Solución	PEROXIDACION DE LIPIDOS +(BHT+DFO)	
	(nmol TBARS/mg Prot) ($\bar{X} \pm$ S.E.M.)	Porcentaje vs. Control
<u>30 min.</u>		
Control	0.164 \pm 0.029	-----
QUIN	0.148 \pm 0.039	-9.76
FeSO4	0.648 \pm 0.015 **	295.12
<u>60 min.</u>		
Control	0.144 \pm 0.026	-----
QUIN	0.281 \pm 0.029 *	95.13
FeSO4	0.661 \pm 0.050 **	359.02
<u>120 min.</u>		
Control	0.184 \pm 0.002	-----
QUIN	0.244 \pm 0.022 *	32.60
FeSO4	1.010 \pm 0.050 **	448.91
<u>24 horas</u>		
Control	0.249 \pm 0.009	-----
QUIN	0.236 \pm 0.019	-5.23
FeSO4	0.676 \pm 0.045 **	171.48

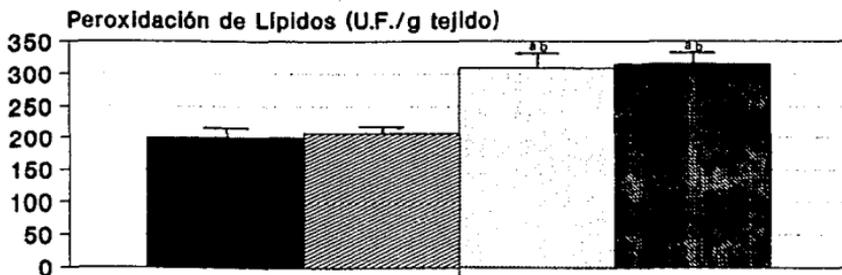
CUADRO II. EFECTO PRO-OXIDANTE EN CUERPO ESTRIADO DE RATA *IN VIVO* A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE LA MICROINYECCION DE ACIDO QUINOLINICO (240 nmol/ul) O FeSO4 (100 nmol/ul). PRUEBA DE DUNNETT (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

mayor porcentaje de peroxidación en el caso del tratamiento con QUIN fué observado a los 60 minutos mientras que para el tratamiento con FeSO_4 fué observado a los 120 minutos.

6.2. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de QUIN en la peroxidación de lípidos en cuerpo estriado a un sólo tiempo después de su administración por la técnica de evaluación de productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación (Dosis-dependencia)

En esta sección se presentan los resultados de los ensayos de evaluación de los productos lipídicos fluorescentes de daño celular como un índice de la peroxidación de lípidos. Esta técnica bioquímica fué aplicada en todos los casos, 2 horas después de la microinyección. En primer término, se comparó el efecto de la administración de concentraciones crecientes de QUIN (120, 240 y 480 nmol/ul) vs. un lote administrado con sol. SBF como control. Los resultados de este experimento están representados gráficamente en la Figura 8, en la cual, cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 5 a 12 experimentos independientes para cada tratamiento. Los niveles de peroxidación se encuentran expresados en U.F./g de tejido/ml de extracto (unidades de fluorescencia/gramo de tejido húmedo/ml de extracto clorofórmico). Para el lote control encontramos un promedio de U.F. de $198.58 \pm$ un error estándar de 13.45; para el lote tratado con una concentración de QUIN de 120 nmol/ul, encontramos un promedio de U.F. de $206.71 \pm$ 8.03, sin observar diferencias

FIGURA 8. EFECTO PRO-OXIDANTE DEL ACIDO QUINOLINICO A DISTINTAS CONCENTRACIONES EN CUERPO ESTRIADO DE RATA



EVALUACION POR TECNICA DE FLUORESCENCIA

TRATAMIENTOS

- | | |
|---|---|
| <p>■ Control (sol. SBF)</p> <p>□ QUIN (240 nmol/μl)</p> | <p>▨ QUIN (120 nmol/μl)</p> <p>■ QUIN (480 nmol/μl)</p> |
|---|---|

PRUEBA DE TUKEY

- a. Diferencias vs. Control a $p < 0.01$
- b. Diferencias vs. QUIN (120 nmol/μl) a $p < 0.01$

n=5-12 ratas

$\bar{x} \pm S.E.M.$

estadísticamente significativas entre éste y el lote control al aplicar la prueba de Tukey para comparación múltiple de medias de tratamientos; en el caso del lote tratado con una concentración de QUIN de 240 nmol/ul obtuvimos un promedio de 309.32 U.F. \pm 22.59, siendo este valor estadísticamente diferente del lote control, así como del lote tratado con QUIN 120 nmol/ul. A la concentración de 480 nmol de QUIN por ul, encontramos un promedio de U.F. de 314.81 \pm 13.14, mostrando también doble significancia estadística con respecto al lote control y a la concentración de 120 nmol/ul de QUIN.

En lo que respecta al efecto pro-oxidante de otros agentes tóxicos, el Cuadro III muestra los resultados obtenidos en la producción de U.F. en un lote experimental previamente tratado con 100 nmol/ul de KA, en otro lote tratado con 100 nmol/ul de FeSO₄, en un lote tratado con MK-801 (10 mg/kg, i.p.) una hora antes de la administración de QUIN 240 nmol/ul y finalmente, los resultados de los lotes experimentales tratados con 120, 240 y 480 nmol/ul de QUIN, así como con el lote control, establecidos en la Figura 8. Tanto el lote tratado con KA, como el tratado con FeSO₄ promovieron la producción de U.F. significativamente con respecto al lote control (prueba de Tukey) demostrando un efecto claramente pro-oxidante. El pretratamiento con MK-801 inhibió el efecto pro-oxidante inducido por el QUIN 240 nmol/ul, sin observar diferencias estadísticamente significativas de las U.F. producidas entre este lote experimental y el lote control. Este

CUADRO III. EFECTO PRO-OXIDANTE DEL ACIDO QUINOLINICO EN CUERPO ESTRIADO DE RATA

TRATAMIENTOS Solución	PEROXIDACION DE LIPIDOS	
	(U.F./g de tejido) ($\bar{X} \pm$ S.E.M.)	(% vs. Control)
Control (SBF)	198.58 \pm 13.45	-----
QUIN (120 nmol/ μ l)	206.71 \pm 8.03	4.09
QUIN (240 nmol/ μ l)	309.32 \pm 22.59 **	55.76
QUIN (480 nmol/ μ l)	314.81 \pm 13.14 **	58.53
QUIN (240 nmol/ μ l) + MK-801 (10 mg/kg)	198.81 \pm 14.45	0.11
KA (100 nmol/ μ l)	247.73 \pm 9.45 *	24.75
FeSO ₄ (100 nmol/ μ l)	358.30 \pm 40.42 **	80.43

PRUEBA DE TUKEY (DIFERENCIAS EXCLUSIVAMENTE VS. VALOR CONTROL, * p<0.05, ** p<0.01)

n=5-12 experimentos independientes

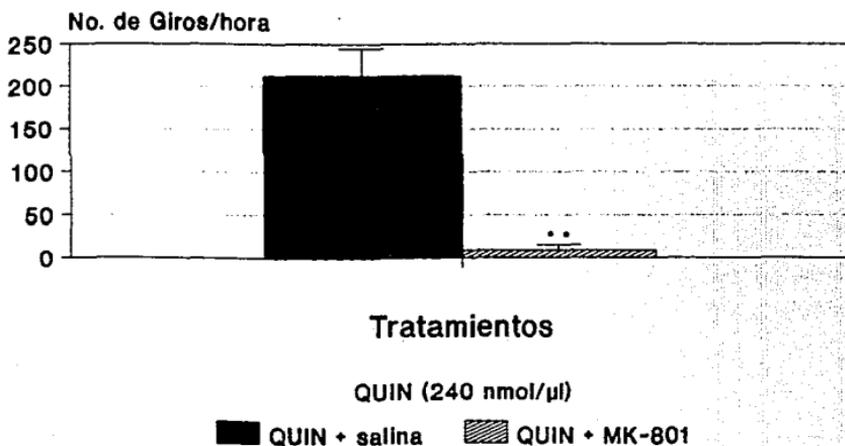
último experimento permitió la evaluación de una posible relación entre los receptores para NMDA y el proceso de la peroxidación.

Los porcentajes de peroxidación de cada lote experimental vs. el lote control, expresados también en el cuadro III, reflejan las diferencias mencionadas.

6.3. Efecto de la administración del QUIN en la conducta de rotación inducida por apomorfina

El efecto tóxico del QUIN fué evaluado mediante la observación de los giros completos de 360°. Los resultados de este proceso de evaluación de la neurotoxicidad se encuentran representados gráficamente en la Figura 9, en donde cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 5 a 7 experimentos independientes para cada tratamiento. Un primer lote control de animales fué administrado con solución SBF intraestriatal y el número de giros observados después de la administración s.c. de apomorfina en todos los animales de este lote fué de cero, por lo que no se le consideró para el análisis estadístico. El lote experimental administrado con 240 nmol/ul de QUIN intraestriatal y evaluado 6 días después, tuvo un promedio de giros de 212.14 \pm un error estándar de 28.61. Un tercer lote experimental de animales, pretratado con una solución de MK-801 (10 mg/kg), una hora antes de ser administrado con 240 nmol/ul de QUIN i.e. y evaluado en su conducta 6 días después, tuvo un promedio de giros de 9 \pm un error estándar de 3.46, mostrando una prevención del

FIGURA 9. EFECTO DE LA ADMINISTRACION INTRAESTRIATAL DE ACIDO QUINOLINICO EN LA CONDUCTA DE GIRO DE LA RATA



n=5-7 animales.

Apomorfina (1 mg/kg, s.c.)

MK-801 (10 mg/kg, i.p.)

(** $p < 0.01$, Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon para comparación de dos muestras)

efecto tóxico del QUIN. El lote tratado con el antagonista más la toxina difirió estadísticamente del que sólo fué tratado con la toxina al aplicársele a los datos de ambos una prueba de Wilcoxon-Mann-Whytney para comparación de datos de 2 muestras. Estos resultados permitieron verificar la neurotoxicidad del QUIN, así como la capacidad antagonica del MK-801 en este modelo.

7. D I S C U S I O N

Las propiedades excitotóxicas del Acido Quinolínico (QUIN), han servido para explicar parcialmente los procesos patológicos y especular acerca de su participación en la etiología de la enfermedades neurodegenerativas (107). Cuando se administra tópicamente en el cuerpo estriado de la rata a concentraciones nanomolares, el ácido quinolínico reproduce las características bioquímicas, histopatológicas y conductuales que se manifiestan en la corea de Huntington (122). El ácido quinolínico es un aminoácido excitador endógeno derivado del L-Triptofano cuya potencia neurotóxica produce lesiones neuronales específicas sobre neuronas espinosas estriatales GABA-érgicas y colinérgicas, además de disminuir significativamente los niveles normales de ácido gamma-aminobutírico (GABA), acetilcolina (Ach) y otros neurotransmisores (104).

Se ha propuesto que el mecanismo por medio del cual el ácido quinolínico ejerce sus efectos tóxicos en sistema nervioso central involucra la activación de los receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA) y un consecuente cambio en la permeabilidad para los iones calcio y sodio, por la apertura masiva de canales membranales, o bien, una liberación desde el interior celular, a nivel mitocondrial, del ión calcio, incrementando los niveles citosólicos del mismo (107,122). A concentraciones citosólicas elevadas, el calcio genera procesos patológicos (tales como la activación de proteasas y lipasas,

alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial y generación de radicales libres) (152,153). Los procesos pro-oxidantes inducidos por elevadas concentraciones de calcio intracelular han sido ampliamente informados (154,168,217). En trabajos previos también se ha evaluado el papel del ácido quinolinico como agente promotor de estrés oxidativo (194).

La existencia de una posible relación entre los procesos de excitotoxicidad y los procesos oxidativos fué evaluada en este trabajo.

Este estudio describe por primera vez el efecto pro-oxidante del ácido quinolinico in vivo en cuerpo estriado de rata. Fué observado un incremento en los niveles de lipoperoxidación por dos técnicas de evaluación distintas. En el caso de la técnica corregida del TBA, en la cual fué evaluado el efecto peroxidante de esta neurotoxina en el tiempo (curso temporal), los 60 minutos son el punto máximo al cual el ácido quinolinico induce un estrés oxidativo. En el caso de la medición de los productos fluorescentes de la peroxidación, las diferentes dosis del ácido quinolinico indujeron un estrés oxidativo que fué dosis-dependiente. Estos hallazgos son de importancia dado que ponen de manifiesto una relación evidente entre los procesos de excitotoxicidad y los procesos oxidativos, particularmente por un mecanismo específico de activación de los receptores para NMDA. Esta relación es comprobada con los resultados obtenidos por la administración previa de un antagonista específico no competitivo

de los receptores para NMDA, el MK-801, el cual fué capaz de prevenir los eventos oxidativos inducidos por el QUIN. Debe considerarse adicionalmente que los tiempos a los cuales fué estudiado el proceso de la lipoperoxidación son muy cortos, lo que sugiere que el incremento en los niveles de peroxidación inducida en este modelo no es el reflejo de la muerte celular (la cual es el resultado de procesos tóxicos prolongados), sino de la activación de procesos fisiopatológicos que conduzcan a un estrés oxidativo, siendo éste un evento mediado por los receptores para NMDA, lo cual permite postular que la peroxidación de lípidos podría ser un mecanismo adicional de la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico en el sistema nervioso central. Este proceso podría explicar parcialmente la naturaleza de la patología observada en la corea de Huntington y otras enfermedades neurológicas, en donde, por factores etiológicos desconocidos, la sobreproducción de algún aminoácido excitador u otra sustancia neuroactiva podría favorecer eventos tóxicos a corto y a largo plazo, y en donde un estrés oxidativo, mediado por la excitación de los receptores, y los consecuentes cambios en la permeabilidad al calcio, podría jugar un papel activo en la patología. Se ha comprobado experimentalmente que otros aminoácidos neurotransmisores, tales como el glutamato, a concentraciones elevadas, pueden inducir la generación de radicales libres y en consecuencia, los eventos por-oxidantes por activación excesiva de los receptores para dichos aminoácidos excitadores (176).

Dos evidencias apoyan la idea de que la peroxidación inducida por el ácido quinolinico no se debe preferencialmente a la muerte celular: a) Los tiempos a los cuales se observa atrofia celular en cuerpo estriado y en hipocampo de rata después de la microinyección de ácido quinolinico, oscilan entre 4 y 7 días (128), mientras que algunas alteraciones bioquímicas producidas por la activación de receptores para NMDA por el ácido quinolinico y otros agonistas se presentan a corto plazo (minutos u horas) (155,163,164,165,218); y b) los eventos tóxicos inducidos por altas concentraciones de calcio citosólico pueden ser asociados a alteraciones conductuales y bioquímicas, pero no a muerte celular (155).

Adicionalmente, el papel del calcio como generador de radicales libres y como agente pro-oxidante en sistema nervioso central está ampliamente reportado (154,168,188,189). Se cuenta, además, con evidencia experimental de que algunos bloqueadores de canales de calcio también actúan como agentes antiperoxidantes (190,219). La serie de eventos relacionados con la activación de los receptores para NMDA y la toxicidad del calcio pueden involucrar adicionalmente procesos como la generación de óxido nítrico (NO) (191,220,221), el cual puede favorecer la producción de radicales libres y los procesos oxidativos (222).

El ácido kaínico (KA) a la concentración de 10 nmol/ul, no incrementa los niveles de peroxidación en este modelo. Esto es notable dado que se tiene evidencia de que a esta concentración

el ácido kainico, una neurotoxina que sirvió como control de muerte celular, produce alteraciones en los niveles de algunos neurotransmisores tales como el GABA y la acetilcolina en administración sistémica y a otras dosis (104). A la concentración de 100 nmol/ul, el ácido kainico promovió de manera significativa los niveles de formación de productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación (LFP).

Con base en la evidencia anteriormente presentada y a los resultados de este trabajo, se apoya la hipótesis de que los radicales libres y la generación de estrés oxidativo pueden representar una alternativa adicional para la explicación de los eventos asociados con los procesos de excitotoxicidad, y a su vez, ser considerados como factores potencialmente etiológicos en enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington.

La aportación de este trabajo permite proponer estudios más profundos y detallados que permitan esclarecer los mecanismos implicados en ciertas patologías y que puedan involucrar procesos oxidativos. Para ello se sugiere, entre otras cosas, que el proceso de la peroxidación sea estudiado en cerebros postmortem de pacientes con corea de Huntington como primera medida de aproximación al estudio de este proceso en pacientes con la enfermedad. Como perspectivas experimentales a futuro, sería de gran valor la evaluación de otros antagonistas del receptor para NMDA como posibles agentes antiperoxidantes, así como la medición de MDA y glutatión reducido en este modelo experimental. La

identificación del posible radical responsable del estrés oxidativo y el empleo de bloqueadores de calcio como anti-peroxidantes en este modelo también serán aspectos experimentales de considerable valor. Finalmente, el empleo de técnicas de evaluación de la peroxidación de lípidos cada vez más confiables puede esclarecer más el papel de este proceso en el modelo de corea.

La alteración de los procesos fisiológicos del sistema nervioso central demanda su estudio y con su mayor entendimiento estaremos más cerca de aportar alternativas terapéuticas a los males, que como la corea de Huntington, aún no pueden ser aliviados.

8. CONCLUSIONES

- El Ácido quinolínico promovió de manera significativa la peroxidación de lípidos en términos de la producción de sustancias reactivas al Ácido tiobarbitárico (TBARS) a los 60 y 120 minutos después de la administración de la toxina.

- El Ácido quinolínico promovió de manera significativa la peroxidación de lípidos en términos de formación de productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación a dos de las concentraciones probadas (240 y 480 nmol/ul). El pretratamiento con MK-801 previene la peroxidación inducida por el ácido quinolínico.

- De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se postula que el estrés oxidativo observado en este modelo experimental, podría estar regulado activamente por la excitación de los receptores para NMDA, idea que está fundamentada en la capacidad peroxidante que demostró tener un agonista específico de tales receptores (Ácido quinolínico), así como de la capacidad antiperoxidante observada por parte de un antagonista específico de los mismos receptores (MK-801).

- Los procesos oxidativos evaluados pueden tener una relación directa con los cambios en la permeabilidad para el calcio, y probablemente al sodio, dado que ha sido ampliamente demostrado en la literatura el papel activo del calcio en los procesos de excitotoxicidad (154), así como en el proceso de la peroxidación de lípidos (189), por lo que entre ambos parece haber un vínculo directo mediado por la activación de receptores para aminoácidos excitadores.

- Los hallazgos encontrados en este trabajo merecen la realización de estudios más profundos y detallados y proponen una explicación adicional para la neurotoxicidad del ácido quinolínico en lo que representa el mejor modelo experimental de la corea de Huntington hasta este momento.

- Se propone para tal efecto, el estudio de los procesos oxidantes inducidos por el ácido quinolínico y otros aminoácidos excitadores endógenos bajo esquemas de administración crónica; la evaluación de los niveles de peroxidación en el mismo modelo mediante el empleo de técnicas más precisas de monitoreo de productos derivados de la peroxidación; la evaluación de los efectos de los agentes antiperoxidantes, bloqueadores de canales

de calcio y antagonistas específicos del receptor para NMDA en dicho modelo; la identificación del posible radical responsable de los procesos oxidativos; y finalmente, el estudio de la actividad de enzimas vinculadas con procesos oxidativos en los modelos de excitotoxicidad.

9. A P E N D I C E

NEUROANATOMIA Y NEUROFISIOLOGIA DE GANGLIOS BASALES

Encajados profundamente dentro de la sustancia blanca del cerebro están los ganglios basales, grandes masas de sustancia gris que se presentan como núcleos celulares específicos bien definidos. Están conformados por núcleo caudal, putamen y globus pallidus, los dos últimos denominados colectivamente núcleo lentiforme. El núcleo caudal y el lentiforme están separados por la cápsula interna, banda principal de fibras de proyección (extractado de Beck, 1977) (223).

La anatomía de los ganglios basales es complicada y muchos de sus núcleos individuales está interconectados entre sí. Sin embargo, existen varios principios generales de organización anatómica que proporcionan datos sobre su función. En primer lugar, la mayoría de las aferencias hacia los ganglios basales se originan de la corteza cerebral. En contraste con el cerebelo, los ganglios basales reciben aferencias no directamente sensoriales de la periferia. En segundo término, una bien desarrollada organización somatotópica a todos los niveles de paso de información a través de los ganglios basales. Por último, muchas de las eferencias generadas en los ganglios basales, regresan a la corteza cerebral vía el tálamo. No se conocen proyecciones eferentes que se extiendan más allá del mesencéfalo y se sabe que los ganglios basales no tienen influencia directa

en la actividad de las motoneuronas del tallo cerebral o de la espina dorsal (224).

En la Figura 10 se presenta una representación esquemática simplificada de la organización de los ganglios basales.

El cuerpo estriado es la mayor área receptora de las aferencias de los ganglios basales. La mayoría de dichas aferencias se originan de varias regiones de la corteza cerebral. Estas proyecciones tienen un efecto excitador en las neuronas estriatales y emplean glutamato como neurotransmisor. Otra importante vía de conexión aferente está representada por el sistema dopaminérgico nigro-estriatal, que se origina de la pars compacta de la substantia nigra (SNpc). A pesar de la controversia acerca de los efectos excitadores ó inhibidores ejercidos por la substantia nigra sobre las neuronas blanco del estriado, la evidencia apunta preferencialmente hacia un efecto inhibitor. El estriado recibe aferencias adicionales de un gran número de otras estructuras incluyendo en núcleo intralaminar y el centrum medianum del tálamo, así como del raffé dorsal del mesencéfalo, aunque la información referente a la función precisa de estas vías es limitada (224).

A pesar de que los dos componentes principales del estriado: el caudado y el putamen, fueron considerados por mucho tiempo como una sola estructura funcional, hoy se sabe que las proyecciones de estos dos componentes se originan de diferentes

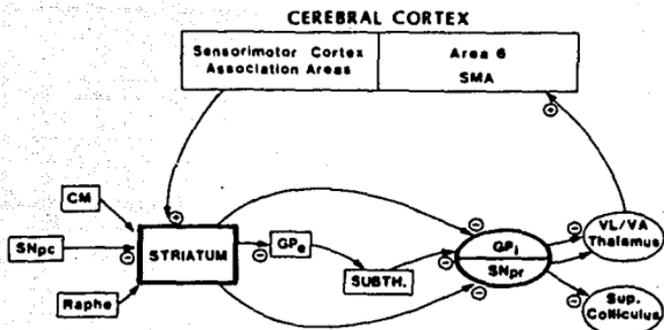


FIG. 10. Diagrama esquemático mostrando algunas de las conexiones anatómicas de los ganglios basales. Para presentar un esquema simplificado, varias vías -- han sido omitidas. Las aferencias al estriado, el mayor centro receptor de los ganglios basales, se muestran a la izquierda de la ilustración. Las -- aferencias del mismo hacia otros núcleos y sus -- respectivas proyecciones eferentes aparecen a la derecha de la ilustración (Tomado de McGeer G.E., Staines A.W. y McGeer L.P. Can. J. Neurol. Sci. - 1984. Vol. 11).

regiones de la corteza cerebral. El caudado recibe muchas de las aferencias de regiones consideradas como asociadas con la corteza, particularmente, las regiones premotoras del lóbulo frontal y de las áreas parietales posteriores. Esta organización anatómica es congruente con observaciones que sugieren que el caudado está involucrado en ciertos tipos de actividad cognitiva y probablemente juegue un papel menor en el control motor. Por su parte, el putamen es una parte integral del sistema motor y muchas de sus aferencias corticales se originan de la corteza motora-sensorial (Áreas 3,1,2,4 y 6) (224).

El estriado envía proyecciones a los segmentos internos y externos del globus pallidus (Gpe y Gpi), así como a la pars reticulata de la substantia nigra (SNpr). El Gpi y la SNpr son considerados como las áreas de mayor aferencia de las conexiones de los ganglios basales. Las neuronas del Gpi y de la SNpr tienen muchas similitudes fisiológicas y anatómicas y se ha propuesto que estas áreas representan una sola estructura que se separa durante el desarrollo de parte de la cápsula interna (224).

Las proyecciones del Gpi van directamente hacia el complejo VL/VA del tálamo. Estas fibras forman las conexiones sinápticas con las neuronas talámicas, las cuales se proyectan de regreso hacia la corteza cerebral. Las eferencias de los ganglios basales van más directamente hacia la corteza premotora (Área 6) y al área motora suplementaria (SMA) que a la corteza motora primaria. Esta es otra área donde la organización de los ganglios basales

difiere de la del cerebelo. Las eferencias cerebelosas, además de pasar a través del complejo VL/VA, van hacia el área 4. Más adn, a pesar de que las proyecciones eferentes de los ganglios basales y del cerebelo están muy próximas en el tálamo, permanecen enteramente separadas y no hay convergencia de la información de estas áreas en neuronas talámicas comunes (224).

El Gpi además envía proyecciones hacia otras estructuras, tales como centrum medianum, habénula lateral (proporcionando una vía potencial entre los ganglios basales y el sistema límbico) y un núcleo pequeño en el mesencéfalo conocido como núcleo tegmental pedúnculopontino. Se sabe, además, que una bien definida organización somatotípica del movimiento relaciona neuronas del Gpi y la SNpr. La actividad neuronal del Gpi está correlacionada con los movimientos de las extremidades, mientras que en SNpr, la actividad celular está relacionada a movimientos específicos de la cabeza y del cuello. Es interesante notar que uno de los blancos de las eferencias de la SNpr es el colículo superior (224).

El núcleo subtalámico juega un papel muy importante en la regulación de las eferencias de los galgios basales. Recibe muchas conexiones del Gpe y de la corteza motora. Las eferencias del núcleo subtalámico van directamente hacia el Gpi y la SNpr, prevaleciendo la creencia de un efecto inhibitor de esta vía. El núcleo subtalámico tiene, pues, una posición única para modular una larga porción de las eferencias que se originan en los

ganglios basales (224).

La Figura 10 sugiere una fácil predicción de los resultados del incremento o decremento de la actividad en un componente de los ganglios basales por una mera sumariación de los efectos excitatorios e inhibitorios y un cálculo del efecto terminal en las neuronas corticales. Por ejemplo, el daño en el sistema dopaminérgico nigrestriatal bloquearía la influencia inhibitoria en las neuronas estriatales, lo que podría traer un incremento en la actividad de las vías inhibitorias hacia el Gpi. Esto resultaría en un decremento en la actividad de las vías del Gpi hacia el complejo VL/VA. Siendo ésta una vía inhibitoria, es lógico pensar que el efecto terminal de la pérdida de aferencias dopaminérgicas hacia el estriado, puede incrementar la actividad de las proyecciones tálamo-corticales. Esto sugiere que la excitación resultante de las neuronas corticales puede ser responsable de algunas de las características del parkinsonismo, que puede estar asociado con el incremento en la actividad de las eferencias motoras. Sin embargo, la Figura 10 no indica la complejidad de los procesos internos de cada una de las estructuras individuales del sistema. Por ejemplo, algunas de las proyecciones aferentes hacia el estriado actúan directamente en las neuronas eferentes estriatales, muchas de las aferencias originadas en corteza cerebral y SNpc parecen formar sinapsis con interneuronas colinérgicas en el estriado. Más aún, existe evidencia de la existencia de receptores presinápticos en el

estriado, por lo que se ha propuesto que los dos mayores sistemas aferentes que se proyectan hacia el estriado, están recíprocamente relacionados a nivel presináptico y postsináptico. Las aferencias dopaminérgicas de la SNpc pueden tener actividad en neuronas estriatales por inhibición directa y además por inhibición presináptica de las aferencias excitadoras de la corteza. Todo ésto establece la falta de conocimiento que aún existe sobre la compleja circuitería de los ganglios basales (224).

La neuroanatomía bioquímica del sistema nervioso central puede ser agrupada en tres grandes clases: a) los neurotransmisores aminoácidos, presentes en el tejido en $\mu\text{mol/g}$, b) las aminas neurotransmisoras, en nmol/g , y c) los péptidos, en pmol/g . Muchos de los neurotransmisores enlistados en el Cuadro IV están presentes en el sistema extrapiramidal, algunos de ellos en relativamente altas concentraciones comparadas con otras regiones cerebrales (225).

Como se observa en la Figura 11, las proyecciones eferentes del caudado-putamen (CP) son simples. Cinco neurotransmisores están implicados en éstas: 1) encefalina (Enk), en las proyecciones del CP hacia el globus pallidus (GP), 2) Sustancia P (SP), en proyecciones hacia GP, substantia nigra (SN) y núcleo entopeduncular (EP), 3) Dinorfina (DY), también hacia GP, SN y EP, 4) Acido gamma-aminobutírico (GABA), hacia SN y GP, y 5) colecistoquinina (CCK), hacia SN. Con respecto a las vías

CUADRO IV

Approximate levels in rat brain of various neurotransmitters
(in Picomoles per gram)

AMINO ACIDS (70-90% of central neurons)		AMINES (5-20% of central neurons)	
*Glutamate	14,000,000	*Acetylcholine	25,000
Aspartate	4,000,000	*Dopamine	6,500
*GABA	2,500,000	*Noradrenaline	2,500
*Glycine	2,000,000	*Serotonin	2,500
		*Histamine	1,000

PEPTIDES (Partial List)
(less than 5-10% of central neurons)

*CCK	470	LHRH	7
*Met-enkephalin	350	*Dynorphin	4
*Substance P	100	Bradykinin	<1
*VIP	40	ACTH	<1
*Somatostatin	30	α -MSH	<1
*Neurotensin	12	*TRH	<0.3
		Bombesin	<0.2

* Present in the basal ganglia

Tomado de McGeer G.E., Staines A.W.
y McGeer L.P. J. Can. Neurol. Sci.
1984. Vol. 11).

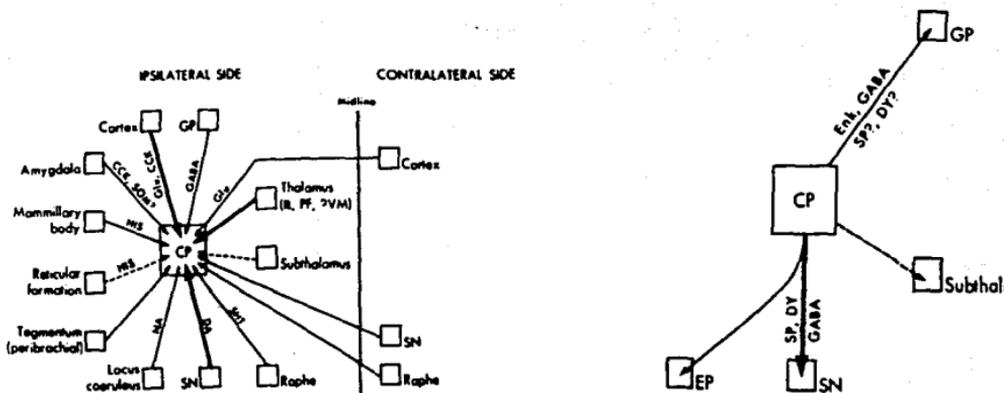


FIG. 11. Aferencias y proyecciones eferentes del Caudado/Putamen. En estos diagramas el tamaño y localización de los núcleos es ignorado y las vías pueden involucrar otros neurotransmisores adicionales al mostrado. Algunas vías han sido demostradas y otras son especulativas (Tomado de McGeer, G.E., Staines A.W. and McGeer L.P., Can. J. Neurol. Sci. 1984, Vol 11.).

aferentes hacia el CP, la mayoría llegan del tálamo, la corteza y SN. Hay aferencias menores de locus coeruleus, raffé dorsal, amígdala y, probablemente, del cuerpo mamilar, núcleo tegmental pedúnculo pontino, formación reticular pontina y subtálamo. Las proyecciones desde SN y el raffé se dirigen hacia el CP contralateral, pero las mismas células no se proyectan bilateralmente. Las proyecciones prefrontal y de SN hacia el CP, son convergentes. A grandes rasgos, el CP recibe Glutamato (Glu) de corteza contra e ipsilateral, GABA de GP, CCK de corteza ipsilateral y amígdala, histamina (HIS) de cuerpo mamilar y formación reticular pontina, noradrenalina (NA) de locus coeruleus, dopamina (DA) de SN y serotonina (5-HT) del raffé ipsilateral (225).

Por otra parte, el GP recibe GABA de CP y nucleus accumbens, encefalina, sustancia P y dinorfina de CP, y dopamina de SN. Las proyecciones eferentes del GP hacia CP, SN, subtálamo y EP, son esencialmente GABAérgicas (225).

Por su parte, las proyecciones aferentes hacia SN reciben GABA de GP, CP, nucleus accumbens y corteza motora y prefrontal, sustancia P y dinorfina de CP, glutamato de corteza motora y prefrontal, acetilcolina (ACh) del tegmentum, oxitocina (OXY) y vasopresina (AVP) del hipotálamo anterior, y serotonina del raffé dorsal. Finalmente, las vías eferentes de la SN, preferencialmente GABAérgicas y dopaminérgicas, envían dopamina hacia CP, GP, amígdala, bulbos olfatorios, subtálamo y espina

dorsal, GABA hacia colículo superior, tálamo y tegmentum (225).

La relevancia del estudio de la neuroanatomía y la neurofisiología de los ganglios basales, de las vías aferentes y eferentes, radica en el conocimiento del consecuente control neuroquímico de las mismas, y el resultado de las alteraciones de estas proyecciones proporciona las bases para el análisis de la patogénesis de enfermedades como el mal de Parkinson, Alzheimer, la corea de Huntington y otras más en donde la atrofia de los ganglios basales es determinante (225).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Shoulson, I. (1984): Huntington's Disease: A Decade of Progress. *Neurol. Clin.* 2(3): 515-526.
2. Alonso, M.E. et al. (1989): Importance of Hereditary Disease at a Neuropsychiatric Institute in Mexico City. *Gen. Epidemiol.* 6: 589-595.
3. Huntington, G. (1872): On Chorea. Lea and Blanchard. Philadelphia. *Med. Surg. Rep.* 26: 317.
4. Joynt, J.R. (1990): The Extrapyramidal System and Disorders of Movement. In: *Clinical Neurology*. Vol. 3. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, U.S.A. Chap. 38: 49-57.
5. Shoulson, I. (1982): Care of Patients and Families With Huntington's Disease. In: Marsden, C.D. and Fahn, S. (eds): *Movement Disorders*. London Butterworth.
6. Leigh, R.J. et al. (1983): Abnormal Ocular Motor Control in Huntington's Disease. *Neurology*. 33: 1268-1275.
7. Butters, N. et al. (1978): Comparison of the Neuropsychological Deficits Associated With Early and Advanced Huntington's Disease. *Arch. Neurol.* 35: 585-589.
8. Fisher, J.M. et al. (1983): Dementia in Huntington's Disease: A Cross-Sectional Analysis of Intellectual Decline. In: Mayeux, R. and Rosen, R.G. (eds): *The Dementias*. New York. Raven Press.
9. Caine, E.D. and Shoulson, I. (1983): Psychiatric Syndromes in Huntington's Disease. *Am. J. Psych.* 140: 728-733.
10. Byers, R.K. et al. (1973): Huntington's Disease in Children: Neuropathologic Study of Four Cases. *Neurology*. 23: 561-569.
11. Meyers, R.H. et al. (1983): Maternal Transmission in Huntington's Disease. *Lancet*. 1: 208-210.
12. Osborne, J.B. and Young, A.B. (1982): Quantitative Autoradiography of Neurotransmitter Receptors in Huntington's Disease. *Neurology*. 32: 354-358.
13. Marsden, C.D. and Schachter, M. (1981): Assessment of Extrapyramidal Disorders. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 11: 129-151.
14. Bonilla, E. et al. (1983): Huntington's Disease in Venezuela: Motoric Features and Functional Decline. *Neurology*. 4(suppl): 86.
15. Shoulson, I. (1981): Huntington's Disease: Anti-Neurotoxic Therapeutic Strategies. In: Fuxe, K., Roberts, R. and Schwarcz, R. (eds): *Excitotoxins*. London, MacMillan.
16. Hayden, M.R. (1981): Huntington's Chorea. Springer-Verlag.
17. Folstein, S.E. et al. (1986): The Diagnosis of Huntington's Disease. *Neurology*. 36: 1276-1283.
18. Myers, R.H. et al. (1985): Huntington's Disease: Genetics, Chemical Pathology and Management. *Prog. Med. Gen.* 6: 91-122.
19. Stern, R. and Eldridge, R. (1975): Attitudes of Patients and Their Relatives to Huntington's Disease. *J. Med. Gen.* 12: 217-223.

20. Mastromauro, C. et al. (1986): Change in Attitudes Toward Presymptomatic Testing in Huntington's Disease. *Am. J. Med. Gen.* 24: 369-371.
21. Weiner, W.J. and Long, A.E. (1989): In: *Movement Disorders: A Comprehensive Survey*. Chap. 6. Mount Kisco, N.Y. Futura Publishing Co.
22. Gusella, J.F. et al. (1983): A Polymorphic DNA Marker Genetically Linked to Huntington's Disease. *Nature*. 306: 234-238.
23. Alzheimer, A. (1911): Huntingtonische Chorea und die choreatischen Bewegungen überhaupt. *Zeitschrift für die Gesamte. In: Neurologie und Psychiatrie*. 3: 891.
24. Jelgersma, G. (1908): Neue Anatomische Befunde bei Paralysis Agitans und Chronischer Chorea. In: *Neurologisches Zentralblatt*. 27: 995-996.
25. Stone, T.T. and Falstein, E.I. (1938): Pathology of Huntington's Chorea II. *J. Nerv. Ment. Dis.* 88: 602-626.
26. Corsellis, J.A. (1976): Aging and Dementia. In: Blackwood, W. and Corsellis, J.A. (eds): *Greenfield's Neuropathology*. Third Edition. London. Edward Arnold Publishers.
27. Escobar, A. and Nieto, D. (1973): Some Considerations on the Clinical and Pathological Findings in Akinetic Chorea. In: *Advances in Neurology*. Vol. 1. New York. Raven Press.
28. Dom, R. et al. (1973): A Cytometric Study of the Putamen in Different Types of Huntington's Chorea. In: *Advances in Neurology*. Vol. 1. New York. Raven Press.
29. Liss, L. et al. (1973): Rigid Forms of Huntington's Chorea: A Clinicopathological Study of Three Cases. In: *Advances in Neurology*. Vol. 1. New York. Raven Press.
30. Bugiani, O. et al. (1984): Huntington's Disease: Survival of Large Striatal Neurons in the Rigid Variant. *Ann. Neurol.* 15: 154-156.
31. Martin, J.B. and Gusella, J.F. (1986): Huntington's Disease: Pathogenesis and Management. *N. Engl. J. Med.* 315: 1267-1276.
32. Bruyn, G.W. et al. (1976): Huntington's Chorea: Current Neuropathological Status. In: Chase, T.N., Wexler, N.S. and Barbeau, A. (eds): *Advances in Neurology*. Vol. 23. New York. Raven Press.
33. Graveland, G.A. et al. (1985): Evidence for Degenerative and Regenerative Changes in Neostriatal Spiny Neurons in Huntington's Disease. *Science*. 22: 770-773.
34. Averbach, P. (1980): Histopathology of Acute Cell Loss in Huntington's Chorea Brains. *J. Pathol.* 132: 55-61.
35. Ross, R.A. et al. (1985): Neuronal Distribution in the Putamen in Huntington's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 48: 422-425.
36. Carrasco L.H. and Mukherji, C.S. (1986): Atrophy of Corpus Striatum in Normal Male at Risk of Huntington's Chorea. *Lancet* (letter). 1: 1388-1389.

37. Dexter, D.J. et al. (1991): Alterations in the Levels of Iron, Ferritin and Other Trace Metals in Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases Affecting the Basal Ganglia. *Brain*. 114: 1953-1975.
38. Bird, E.D. (1980): Chemical Pathology in Huntington's Disease. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 533-551.
39. Klawans, H.L. (1970): A Pharmacological Analysis of Huntington's Chorea. *Eur. Neurol.* 4: 148-163.
40. Reisine, T.D. et al. (1978): Characterization of Brain Dopaminergic Receptors in Huntington's Disease. *Comm. Psychopharmacol.* 2: 79-84.
41. Melamed, E. et al. (1982): Huntington's Chorea is Not Associated With Hyperactivity of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons: Studies in Postmortem Tissues and in Rats With Kainic Acid Lesions. *Neurology*. 32: 640-644.
42. Fahn, S. and Libach, R. (1971): Monoamines in the Human Neostriatum. *J. Neurol. Sci.* 14: 427-455.
43. Bird, E.D. and Iversen, L.L. (1974): Huntington's Chorea: Postmortem Measurement of Glutamic Acid-Decarboxylase, Choline Acetyltransferase and Dopamine in Basal Ganglia. *Brain*. 97: 457-472.
44. Spokes, E.G. et al. (1979): Differential Effects of Agonal States of Measurements of GABA and Glutamate Decarboxylase in Human Postmortem Brain Tissue From Control and Huntington's Chorea Subjects. *J. Neurochem.* 33: 773-778.
45. Spokes, E.G. et al. (1980): Distribution of GABA in Postmortem Brain Tissue From Control, Psychotic and Huntington's Chorea Subjects. *J. Neurol. Sci.* 48: 303-313.
46. Aquilonius, S.M. and Sjostrom, R. (1971): Cholinergic and Dopaminergic Mechanisms in Huntington's Chorea. *Life Sci.* 10: 405-414.
47. McGeer, P.L. et al. (1973): Choline Acetylase and Glutamic Decarboxylase in Huntington's Chorea. *Neurology*. 23: 912-917.
48. Spokes, E.G. (1980): Neurochemical Alterations in Huntington's Chorea: A Study of Postmortem Brain Tissue. *Brain*. 103: 179-210.
49. Chase, T.N. (1973): Biochemical and Pharmacological Studies of Monoamines in Huntington's Chorea. In: Barbeau, A., Chase, T.N. and Paulson, G.W. (eds): *Advances in Neurology*. Vol 1. New York. Raven Press. 533-542.
50. Gayle, J.S. et al. (1978): Human Brain Substance P: Distribution in Controls and Huntington's Chorea. *J. Neurochem.* 30: 633-634.
51. Emson, P.C. et al. (1980): Regional Distribution of Methionine-Enkephalin and Substance P like Immunoreactivity in Normal Human Brain and in Huntington's Disease. *Brain Res.* 199: 147-160.
52. Emson, P.C. et al. (1980): Reduction in Cholecystokinin-Like Immunoreactivity in the Basal Ganglia in Huntington's Disease. *Brain Res.* 198: 497-500.

53. Emson, P.C. et al. (1979): Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) Distribution in Normal Human Brain and in Huntington's Disease. *Brain Res.* 173: 174-178.
54. Sanberg, P.R. and Johnston, G.A. (1981): Glutamate and Huntington's Disease. *Med. J. Aust.* 2: 460-465.
55. Arregui, A. et al. (1977): Huntington's Chorea: Selective Depletion of Activity of Angiotensin Converting Enzyme in the Corpus Striatum. *Ann. Neurol.* 2: 294-298.
56. Aronin, N. et al. (1983): Somatostatin is Increased in the Basal Ganglia in Huntington's Disease. *Ann. Neurol.* 13: 519-526.
57. Dawbarn, D. et al. (1985): Survival of Basal Ganglia Neuropeptide Y-1 Somatostatin Neurons in Huntington's Disease. *Brain Res.* 340: 251-260.
58. Ferrante, R.J. et al. (1985): Selective Sparing of a Class of Striatal Neurons in Huntington's Disease. *Science.* 230: 561-563.
59. Whitehouse, P.J. et al. (1985): Neurotransmitter Receptor Alterations in Huntington's Disease: Autoradiographic and Homogenate Studies With Special Reference to Benzodiazepine Receptor Complexes. *Ann. Neurol.* 18: 202-210.
60. Enna, S.J. et al. (1976): Huntington's Disease: Changes in Neurotransmitter Receptors in the Brain. *N. Engl. J. Med.* 294: 1305-1309.
61. Young, A.B. et al. (1988): NMDA Receptor Losses in Putamen From Patients With Huntington's Disease. *Science.* 241: 981-983.
62. Albin, L.R. et al. (1990): Abnormalities of Striatal Projection Neurons and N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Presymptomatic Huntington's Disease. *N. Engl. J. Med.* 322: 1293-1298.
63. Housman, D. and Gusella, J.F. (1983): Application of Recombinant DNA Techniques to Neurogenetic Disorders. In: Kety, S.S., Rowland, L.P. and Sidman, R.L. (eds): *Genetics of Neurological and Psychiatric Disorders.* New York. Raven Press.
64. Farrer, L.A. and Yu, P.L. (1985): Anthropometric Discrimination Among Affected, At-Risk and Not-At-Risk Individuals in Families With Huntington's Disease. *Am. J. Med. Genet.* 21: 307-316.
65. Brackenridge, C.J. (1980): Factors Affecting the Age at Onset of Huntington's Disease. *Med. J. Aust.* 1: 261-263.
66. Wallace, D.C. and Hall, A.C. (1972): Evidence of Genetic Heterogeneity in Huntington's Chorea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 35: 789-800.
67. Barbeau, A. (1970): Juvenile Huntington's Chorea. *Lancet.* 2: 937.
68. Merritt, A.D. et al. (1969): Juvenile Huntington's Chorea. *Prog. Neurogen. Excerpta Med.* 175: 645.
69. Myers, R.H. et al. (1985): Maternal Factors in Onset of Huntington's Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 350-357.

70. Shoulson, I. and Fahn, S. (1979): Huntington's Disease: Clinical Care and Evaluation. *Neurology*. 29: 1-3.
71. Shoulson, I. (1981): Huntington's Disease: Functional Capacities in Patients Treated With Neuroleptic and Antidepressant Drugs. *Neurology*. 31: 1333-1335.
72. Birkmayer, W. (1969): Der Alpha-Methyl-P-Tyrosine Effekt bei Extrapyramidilen Erkrankungen. *Wienklien Wochenschr.* 81: 10-12.
73. Klawans, H.L. and Weiner, W.J. (1974): The Effect of D-Amphetamine on Choreiform Movement Disorders. *Neurology*. 24: 312-318.
74. Loeb, C. et al. (1976): Levodopa and Huntington's Chorea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 39: 958-961.
75. Michaelides, D.N. (1975): The Effects of Levodopa in Chronic Progressive Hereditary Chorea (Huntington's Chorea): Case Report. *Milit. Med.* 140: 793-794.
76. Lal, S. et al. (1973): Apomorphine, Pimozole, L-Dopa and Probenecid Test in Huntington's Chorea. *Psychiat. Neurol. Neurochir.* 76: 113-117.
77. Kartzinel, R. et al. Bromocriptine in Huntington's Chorea. *Arch. Neurol.* 33: 517-518.
78. Shoulson, I. et al. (1978): Huntington's Disease: Treatment With Muscimol, a GABA-Mimetic Drug. *Ann. Neurol.* 4: 279-284.
79. Pearce, I. et al. (1977): Valproate Sodium in Huntington's Chorea. *Arch. Neurol.* 34: 306-309.
80. Perry, J.L. et al. (1980): Failure of Aminoxyacetic Acid Therapy in Huntington's Disease. *Neurology*. 30: 772-775.
81. Manyam, N. et al. (1980): Effect of Isoniazid on CFS and Plasma GABA Levels in Huntington's Disease. *Life Sci.* 26: 1303-1308.
82. Foster, L.N. et al. (1983): THIP Treatment of Huntington's Disease. *Neurology*. 33: 637-639.
83. Kurlan. Unpublished Data (1990).
84. Davis, K.L. (1976): Choline in Tardive Dyskinesia and Huntington's Disease. *Life Sci.* 19: 1507-1516.
85. Shults, C. et al. (1986): Huntington's Disease: Effect of Cysteamine, a Somatostatin-Depleting Agent. *Neurology*. 36: 1099-1102.
86. Olney, J.W. (1971): *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30: 75-90.
87. Olney, J.W. (1974): In: *Heritable Disorders at Amino Acid Metabolism*. W.L. Nyhan (ed). Wiley and Sons, New York. 501-512.
88. Olney, J.W. et al. (1971): *Exp. Brain Res.* 14: 61-76.
89. Johnston, R.A.G. et al. (1968): *Biochem. Pharmacol.* 17: 2488-2489.
90. Shinozaki, H. and Kinoshi, S. (1970): *Brain Res.* 24: 368-371.
91. Coyle, J.T. et al. (1981): *Neurosci. Res. Prog. Bull.* 19.
92. Coyle, J.T. and Schwarcz, R. (1976): *Nature*. 263: 244-246.
93. McGeer, G.E. and McGeer, L.P. (1976): *Nature*. 263: 517-518.
94. Nadler, J.V. (1979): *Life Sci.* 24: 289-300.

95. Aldinio, C. et al. (1973): The Effects of Intrahippocampal Ibotenic Acid and Their Blockade by (-)-2-Amino-7-Phosphonoheptanoic Acid: Morphological and Electroencephalographical Analysis. *Exp. Brain Res.* 51: 36-44.
96. French, E.D. et al. (1982): *Neurosci.* 7: 2525-2536.
97. Watkins, J.C. and Evans, R.H. (1981): *Ann. Rev. Pharmacol.* 21: 165-204.
98. Köhler, C. and Schwarcz, R. (1983): *Neurosci.* 8: 819-835.
99. Ben-Ari, Y. et al. (1979): *Brain Res.* 165: 362-365.
100. Zaczek, R. et al. (1981): *Neuropharmacol.* 20: 183-189.
101. Bruyn, G.W. (1979): In: *Advances in Neurology*. Chase, T.N., Wexler, N.S. and Barbeau, A. (eds). New York. Raven Press.
102. Burch, P.R.J. (1979): In: *Advances in Neurology*. Chase, T.N., Wexler, N.S. and Barbeau, A. (eds). New York. Raven Press. 43-57.
103. Hantraye, P. et al. (1990): A Primate Model of Huntington's Disease: Behavioral and Anatomical Studies of Unilateral Excitotoxic Lesions of the Caudate-Putamen in the Baboon. *Exp. Neurol.* 108: 91-104.
104. Beal, F.M. et al. (1986): Replication of the Neurochemical Characteristics of Huntington's Disease by Quinolinic Acid. *Nature (letter)*. 321: 168-171.
105. Vincent, S.R. et al. (1983): *J. Comp. Neurol.* 217: 252-263.
106. Gholson, R.K. et al. (1964): *J. Biol. Chem.* 239: 1208-1214.
107. Schwarcz, R. et al. (1984): Excitotoxic Models for Neurodegenerative Disorders. *Life Sci.* 35: 19-32.
108. Heyes, M.P. et al. (1989): Cerebrospinal Fluid Quinolinic Acid Concentrations are Increased in Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Ann. Neurol.* 26 (2): 275-277.
109. Schwarcz, R. et al. (1983): Quinolinic Acid: An Endogenous Metabolite That Produce Axon-Sparing Lesions in Rat Brain. *Science.* 219: 316-318.
110. Schurr, A. et al. (1991): Neurotoxicity of Quinolinic Acid and Its Derivates in Hypoxic Rat Hippocampal Slices. *Brain Res.* 568: 199-204.
111. Hagberg, H. et al. (1985): Ischemia-Induced Shift of Inhibitory and Excitatory Amino Acids From Intra- to Extracellular Compartments. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 413-419.
112. Heyes, P.M. et al. (1990): Brain and Plasma Quinolinic Acid in Profound Insulin-Induced Hypoglycemia. *J. Neurochem.* 54 (3): 1027-1033.
113. Morgan, P.F. (1991): Is Quinolinic Acid an Endogenous Excitotoxin in Alcohol Withdrawal? *Med. Hypotheses.* 36 (2): 118-121.
114. Vezzani, A. et al. (1991): Production of Quinolinic Acid and Kynurenic Acid by Human Glioma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 294: 691-695.

115. Wardley-Smith, B. et al. (1989): The Effects of Kynurenic Acid, Quinolinic Acid and Other Metabolites of Tryptophan on the Development of the High Pressure Neurological Syndrome in the Rat. *Neuropharmacol.* 28 (1): 43-47.
116. Heyes, P.M. and Lackner, A. (1990): Increased Cerebrospinal Fluid Quinolinic Acid, Kynurenic Acid and L-Kynurenine in Acute Septicemia. *J. Neurochem.* 55 (1): 338-341.
117. Beal, M.F. et al. (1988): Systemic Approaches to Modifying Quinolinic Acid Striatal Lesions in Rats. *J. Neurosci.* 8 (10): 3901-3908.
118. Schwarcz, R. et al. (1988): 3-Hydroxyanthranilate Oxygenase Activity is Increased in the Brain of Huntington's Disease Victims. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4079-4081.
119. Schwarcz, R. et al. (1988): Cerebrospinal Fluid Levels of Quinolinic Acid in Huntington's Disease and Schizophrenia. *Ann. Neurol.* 24: 580-582.
120. Heyes, P.M. et al. (1985): Normal Excretion of Quinolinic Acid in Huntington's Disease. *Life Sci.* 37: 1811-1816.
121. Reynolds, G.P. et al. (1988): Brain Quinolinic Acid in Huntington's Disease. *J. Neurochem.* 50: 1959-1960.
122. Bruyn, R.P.M. and Stoof, J.C. (1990): The Quinolinic Acid Hypothesis in Huntington's Chorea. *J. Neurol. Sci.* 95: 29-38.
123. Whetsell Jr., W.O. and Schwarcz, R. (1989): Prolonged Exposure to Submicromolar Concentrations of Quinolinic Acid Causes Excitotoxic Damage in Organotypic Cultures of Rat Corticostriatal System. *Neurosci. Lett.* 97: 271-275.
124. Yamada, K. et al. (1990): Neurotoxicity Induced by Continuous Infusion of Quinolinic Acid Into the Lateral Ventricle in Rats. *Neurosci. Lett.* 118: 128-131.
125. Wildholz, M., Budavari, S., Stroumstos, Y.L. and Fertig, N.M. (eds). (1976): In: *The Merck Index*. Ninth Edition. New Jersey. Merck and Co. Inc.
126. Wolfensberger, M. et al. (1983): Identification of Quinolinic Acid in Rat and Human Brain Tissue. *Neurosci. Lett.* 41: 247-252.
127. Moroni, F. et al. (1984): The Excitotoxin Quinolinic Acid is Present in Several Mammals and Its Cortical Content Increases During the Aging Process. *Neurosci. Lett.* 47: 51-55.
128. DiFligia, M. (1989): Excitotoxic Models of the Neostriatum: A Model for Huntington's Disease. *TINS.*
129. Côté, L. (1985): Aging of the Brain and Dementia. In: *Principles of Neural Sciences*. Kandel, R.E. and Schwartz, H.J. (eds). Elsevier Science Publishing Co. 784-792.
130. Vender, A.D. (1975): The Kynurenine Pathway of Tryptophan Catabolism. In: *Amino Acid Metabolism*. John Wiley and Sons. U.S.A. 172-177.
131. Speciale, C. and Schwarcz, R. (1988): Effect of Systemic Kainate Administration on Cerebral Quinolinic Acid Metabolism in the Rat. *Exp. Neurol.* 99: 213-218.

132. Garthwaite, G. and Garthwaite, J. (1987): Quinolinic Acid Mimics Neurotoxic Actions of N-Methyl-D-Aspartate in Rat Cerebellar Slices. *Neurosci. Lett.* 79: 35-39.
133. Sanberg, R. et al. (1989): The Quinolinic Acid Model of Huntington's Disease: Locomotor Abnormalities. *Exp. Neurol.* 105: 45-53.
134. Norman, B.A. (1991): Differential Loss of Neurochemical Markers Following Quinolinic Acid-Induced Lesions of Rat Striatum. 114: 132-135.
135. Vezzani, A. et al. (1989): Studies on the Potential Neurotoxic and Convulsivant Effects of Increased Blood Levels of Quinolinic Acid in Rats With Altered Blood-Brain Barrier Permeability. 106: 90-98.
136. Naoi, M. (1986): Quinolinic Acid: An Endogenous Inhibitor Specific for Type B Monoamine Oxidase in Human Brain Synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 74: 232-236.
137. Sharp, W.J. et al. (1990): The NMDA Receptor Mediates Cortical Induction of Fos and Fos-Related Antigens Following Cortical Injury. *Exp. Neurol.* 109: 323-332.
138. Bahhit, Ch. et al. (1991): Increase in Glia-Derived Nerve Growth Factor Following Destruction of Hippocampal Neurons. *Brain Res.* 560: 76-83.
139. Moroni, F. et al. (1991): Modulation of Quinolinic and Kynurenic Acid Content in the Rat Brain: Effects of Excitotoxins and Nicotinyllalanina. *J. Neurochem.* 57: 1630-1635.
140. Connick, J. et al. (1988): Decrease in Rat Cerebral Quinolinic Acid Concentration Following Chronic Hydrocortisone Treatment. *Neurosci. Lett.* 88: 216-220.
141. Tulipan, N. et al. (1988): Striatal Grafts Provide Sustained Protection From Kainic and Quinolinic Acid-Induced Damage. *Exp. Neurol.* 102: 325-332.
142. Connick, J.H. and Stone, T.W. (1989): Quinolinic Acid Neurotoxicity: Protection by Intracerebral Phenylisopropyladenosine (PIA) and Potentiation by Hypotension. *Neurosci. Lett.* 101: 191-196.
143. Kemp, A.J. et al. (1987): Non-Competitive Antagonist of Excitatory Amino Acid Receptors. *TINS.* 10 (7): 294-298.
144. Clifford, B.D. et al. (1990): Ketamine, Phencyclidine and MK-801 Protect Against Kainic Acid-Induced Seizure-Related Brain Damage. *Epilepsia.* 31 (4): 382-390.
145. Lekieffre, D. et al. (1990): Kynurenic Acid Antagonizes Hippocampal Quinolinic Acid Neurotoxicity: Behavioral and Histological Evaluation. *Neurosci. Lett.* 120: 31-33.
146. Beal, F.M. et al. (1992): Kynurenic Acid Concentrations are Reduced in Huntington's Disease Cerebral Cortex. *J. Neurol. Sci.* 108: 80-87.
147. Giordano, M. et al. (1990): MK-801 Prevents Quinolinic Acid-Induced Behavioral Deficits and Neurotoxicity in the Striatum. *Brain Res. Bull.* 24: 313-319.

148. Norman, B.A. et al. (1990): Chronic Treatment With MK-801 Increases the Quinolinic Acid-Induced Loss of D-1 Dopamine Receptors in Rat Striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 363-366.
149. Kida, E. and Matyja, E. (1990): Prevention of Quinolinic Acid Neurotoxicity in Rat Hippocampus *in vitro* by Zinc: Ultrastructural Observations. *Neurosci. Lett.* 37(2): 347-352.
150. Simon, P.R. et al. (1984): Blockade of N-Methyl-D-Aspartate Receptors May Protect Against Ischemic Damage in the Brain. *Science.* 850-852.
151. Rothman, S.M. and Olney, J.W. (1987): Excitotoxicity and the NMDA Receptor. *TINS.* 10: 299-302.
152. Cheung, Y.J. et al. (1986): Calcium and Ischemic Injury. In: Epstein, H.F. (ed): *Mechanisms of Disease.* New Engl. J. Med. 314 (26): 1670-1676.
153. Choi, W.D. (1988): Calcium-Mediated Neurotoxicity: Relationship to Specific Channel Types and Role in Ischemic Damage. *TINS.* 11 (10): 465-469.
154. Bondy, C.S. (1989): Intracellular Calcium and Neurotoxic Events. *Neurotoxicol. Teratol.* 11: 527-531.
155. Vezzani, A. et al. (1988): Quinolinic Acid-Induced Seizures, But Not Nerve Cell Death, Are Associated With Extracellular Ca²⁺ Decrease Assessed in the Hippocampus by Brain Dialysis. *Brain Res.* 454: 289-297.
156. Banick, N.L. et al. (1987): The Multi-Molecular Cascade of Spinal Cord Injury: Studies on Prostanoids, Calcium and Proteinases. *Neurochem. Pathol.* 7: 57-78.
157. Adler, A.J. and Berlyne, G.M. (1985): Effect of Chronic Uremia in the Rat in Cerebral Mitochondrial Calcium Concentrations. *Kidney Int.* 27: 523-529.
158. Farnell, B.J. et al. (1985): Calcium Metabolism in Aluminium Encephalopathy. *Exp. Neurol.* 88: 68-83.
159. Tonge, J.I. et al. (1977): Cerebellar Calcification: A Possible Marker of Lead Poisoning. *Pathology.* 9: 289-300.
160. Korf, J. and Postema, F. (1984): Regional Accumulation and Cation Shifts in Rat Brain by Kainate. *J. Neurochem.* 34: 213-215.
161. Komulainen, H. and Bondy, C.S. (1987): Increased Free Intrasynaptosomal Ca²⁺ by Neurotoxic Organometals: Distinctive Mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88: 77-86.
162. Gutteridge, M.C. and Halliwell, B. (1990): The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *TIBS.* 15: 129-134.
163. MacDermott, B.A. et al. (1986): NMDA-Receptor Activation Increases Cytoplasmic Calcium Concentrations in Cultured Spinal Cord Neurons. *Nature (letter).* 321: 519-522.
164. Tsuzuki, K. et al. (1989): Ion Channels Activated by Quinolinic Acid in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Brain Res.* 481: 258-264.
165. Tsuzuki, K. et al. (1989): Change in Calcium Permeability Caused by Quinolinic Acid in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Neurosci. Lett.* 105: 269-274.

166. Vezzani, A. *et al.* (1988): Effect of Various Calcium Channels Blockers on Three Different Models of Limbic Seizures in Rats. *Neuropharmacol.* 27 (5): 451-458.
167. Eirmel, S. and Schramm, M. (1992): An Endogenous Metal Appears to Regulate NMDA Receptor Mediated $45Ca$ Influx and Toxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells. *Neurosci. Lett.* 137: 198-202.
168. Bors, W. *et al.* (1990): Calcium in Lipid Peroxidation: Does Calcium Interact With Superoxide?. *Arch. Biochem. Biophys.* 278 (1): 269-272.
169. Martinez, A. *et al.* (1988): Cytosolic Free Calcium Levels Increase With Age in Rat Brain Synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 88: 336-342.
170. Sztrihá, L. (1986): Increased Lipid Peroxide Formation in the Rat Forebrain During Kainic Acid Seizures. *Biomed. Biochim. Acta.* 45 (4): 491-494.
171. Miyamoto, M. and Coyle, J.T. (1990): Idebone Attenuates Neuronal Degeneration Induced by Intrastratial Injection of Excitotoxins. *Exp. Neurol.* 108: 38-45.
172. Monteiro, P.H. *et al.* (1989): 6-Hydroxydopamine Releases Iron From Ferritin and Promotes Ferritin-Dependent Lipid Peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38 (23): 4177-4182.
173. Rios, C. and Tapia, R. (1987): Changes in Lipid Peroxidation Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine and 1-Methyl-4-Phenylpyridinium in Mouse Brain Homogenates. *Neurosci. Lett.* 77: 321-326.
174. Zhou, M. *et al.* (1991): Effects of Taurine and Ketamine on Bovine Retinal Membrane Lipid Peroxidation. *Neurosci.* 45 (2): 461-465.
175. Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1991): Redox Modulatory Site of the NMDA Receptor-Channel Complex: Regulation by Oxidized Glutathione. *J. Neurosci. Res.* 30 (3): 582-591.
176. Murphy, T.H. *et al.* (1989): Glutamate Toxicity in a Neuronal Cell Line Involves Inhibition of Cystine Transport Leading to Oxidative Stress. *Neuron.* 2: 1547-1558.
177. Armstead, W.M. *et al.* (1989): Cerebral Superoxide Anion Generation During Seizures in Newborn Pigs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 175-179.
178. Essman, W.B. *et al.* (1989): Free Radicals, Central Nervous System Processes and Brain Functions. In: Das, D.K. and Essman, W.B. (eds). *Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Processes.* Karger, Basel Publishers. 172-191.
179. Halliwell, B. and Gutteridge, M.C.J. (1984): Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
180. Ebadi, M. *et al.* (1991): Methallothionein and Oxidation Reactions in Parkinson's Disease. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 285-290.
181. Jesberger, A.J. and Richardson, S.J. (1991): Oxygen Free Radicals and Brain Dysfunction. *Intern. J. Neurosci.* 57: 1-17.

182. Davies, K. et al. (1990): The Molecular Biology of Aging. Liss, R.A. (ed). New York. 123.
183. Saul, R.L. et al. (1987): Free Radicals, DNA Damage and Aging. In: Warner, H.R., Bulter, N., Sprott, R.L. and Schneider, E.L. (eds). Modern Biological Theories of Aging. Raven Press. New York. 113-129.
184. Birnboim, H.C. (1988): Superoxide Anion May Trigger DNA Strand Breaks in Human Granulocytes by Acting at a Membrane Target. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 551: 82-94.
185. Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982): Biology of Disease: Free-Radicals and Tissue Injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
186. Halliwell, B. (1989): Oxidants and the Central Nervous System: Some Fundamental Questions: Is Oxidant Damage Relevant to Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, Traumatic Injury or Stroke? *Acta Neurol. Scand.* 126: 23-33.
187. Braughler, M.J. (1985): Lipid Peroxidation-Induced Inhibition of t-Aminobutyric Acid Uptake in Rat Brain Synaptosomes: Protection by Glucocorticoid. *J. Neurochem.* 44 (4): 1282-1288.
188. Traystman, J.R. et al. (1991): Oxygen Radical Mechanisms of Brain Injury Following Ischemia and Reperfusion. *TINS.* 1185-1194.
189. LeBel, P.C. and Bondy, C.S. (1991): Oxygen Radicals: Common Mediators of Neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 341-346.
190. Aruoma, I.O. et al. (1991): Free Radical Scavenging and Inhibition of Lipid Peroxidation by P-Blockers and by Agents That Interfere With Calcium Metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 42 (4): 735-743.
191. Moncada, S. et al. (1991): Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol. Reviews.* 43 (2): 109-142.
192. Miyamoto, M. and Coyle, J.J. (1990): Idbone Attenuates Neuronal Degeneration Induced by Intrastriatal Injection of Excitotoxins. *Exp. Neurol.* 108: 38-45.
193. Dykens, J.A. et al. (1987): Mechanism of Kainate Toxicity to Cerebellar Neurons *In vitro* is Analogous to Reperfusion Tissue Injury. *J. Neurochem.* 49: 1222-1228.
194. Rios, C. and Santamaria, A. (1991): Quinolinic Acid is a Potent Lipid Peroxidant in Rat Brain Homogenates. *Neurochem. Res.* 10 (16): 1139-1143.
195. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1985): Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford.
196. Richard, J.M. et al. (1992): High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid Adduct in Biological Materials (Plasma and Human Cells) Using a Commercially Available Reagent. *J. Chromatography.* 577: 9-18.
197. Braughler, M.J. et al. (1986): The Involvement of Iron in Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* 261 (22): 10282-10289.

198. Triggs, J.W. and Willmore, J.L. (1984): In Vivo Lipid Peroxidation in Rat Brain Following Intracortical Fe²⁺ Injection. *J. Neurochem.* 42 (4): 976-980.
199. Wolman, M. (1980): Lipid Pigments (Chromolipids): Their Origin, Nature and Significant. In: *Pathology Annual*. H.L. (ed). New York: Raven Press. 253-267.
200. Tappel, P. et al. (1973): Effect of Antioxidants and Nutrients on Lipid Peroxidation Fluorescent Products and Aging Parameters in the Mouse. *J. Gerontol.* 28: 415-424.
201. Csallany, A.S. et al. (1977): Effect of Dietary Vitamin E and Aging of Tissue Lipofuscin Pigment Concentration in Mice. *J. Nutr.* 107: 1792-1799.
202. Halliwell, B. and Gutteridge, M.C.J. (1986): Iron and Free Radical Reactions: Two Aspects of Antioxidant Protection. *Trends Biochem. Sci.* 11: 372-375.
203. Zaleska, M.M. and Floyd, A.R. (1985): Regional Lipid Peroxidation in Rat Brain In Vitro: Possible Role of Endogenous Iron. *Neurochem. Res.* 10 (3): 397-410.
204. Halliwell, B. (1984): Manganese Ions, Oxidation Reactions and the Superoxide Radicals. *Neurotoxicol.* 5: 113-117.
205. Halliwell, B. and Gutteridge, M.C.J. (1985): The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Diseases. *Mol. Asp. Med.* 8: 89-193.
206. Shoham, S. et al. (1992): Iron Accumulation in the Rat Basal Ganglia After Excitatory Amino Acid Injections-Dissociation from Neuronal Loss. *Exp. Neurol.* 118: 227-241.
207. Hill, J.M. and Switzer III, C. (1984): The Regional Distribution and Cellular Localization of Iron in the Rat Brain. *Neurosci.* 11: 596-603.
208. Willmore, J.L. et al. (1981): Antiperoxidant Pretreatment and Iron-Induced Epileptiform Discharges in the Rat: EEG and Histopathological Studies. *Neurology.* 31: 63-69.
209. Payon, H. et al. (1970): The Pathology of Post-Traumatic Epilepsies. *Epilepsia.* 11: 80-94.
210. Beal, F.M. et al. (1986): Replication of the Neurochemical Characteristics of Huntington's Disease by Quinolinic Acid. *Nature.* 321: 168-171.
211. Metcalf, H.R. et al. (1990): Acetylcholine Content and Distribution in Rat Cortical Synaptosomes After In Vivo Exposure to Quinolinic Acid. *Neurosci. Lett.* 108: 219-224.
212. Norman, B.A. et al. (1990): Sensitization of Rotation Behavior in Rats With Unilateral 6-Hydroxydopamine or Kainic Acid-Induced Lesions. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 37: 755-759.
213. Wilbur, K.M. et al. (1949): The Thiobarbituric Acid Reagent as a Test for the Oxidation of Unsaturated Fatty Acids by Various Agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 24: 305-313.
214. Lowry, O.H. et al. (1951): Protein Measurement With the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
215. Paxinos, G. and Watson, C. (1984): The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press.

216. Waravdekar, V.S. and Saslaw, L.D. (1959): A Sensitive Colorimetric Method for the Estimation of 2-Deoxy-Sugars With the Use of the Malonaldehyde-Thiobarbituric Acid Reaction. *J. Biol. Chem.* 234: 1945-1950.
217. Thomas, E.C. and Reed, J.D. (1988): Effect of Extracellular Ca⁺⁺ Omission on Isolated Hepatocytes. Induction of Oxidative Stress and Cell Injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245 (2): 493-507.
218. McLarnon, G.J. and Curry, K. (1990): Quinolate Activation of N-Methyl-D-Aspartate Ion Channels in Rat Hippocampal Neurons. *Neurosci. Lett.* 116: 341-346.
219. Gonçalves, T. et al. (1991): Antioxidant Effect of Calcium Antagonists on Mitochondrial Membranes Isolated From Different Brain Areas. *Eur. J. Pharmacol.* 704: 315-322.
220. Moncada, S. and Palmer, R.M.J. (1990): The L-Arginine:Nitric Oxide Pathway in the Vessel Wall. In: *Nitric Oxide From L-Arginine: A Bioregulatory System.* Moncada, S. and Higgs, E.A. (eds). Elsevier, Amsterdam. 19-33.
221. Mayer, B. et al. (1989): Biosynthesis of Endothelium-Derived Relaxing Factor: A Cytosolic Enzyme in Aortic Endothelial Cells Ca²⁺-Dependently Converts L-Arginine Into an Activator of Soluble Guanylyl Cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 678-685.
222. Beckman, J.S. et al. (1990): Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1620-1624.
223. Beck, S.W. (1977): *Fisiología Molecular, Celular y Sistemática.* Publicaciones Culturales. México. 484.
224. Lee, G.R. (1984): Physiology of the Basal Ganglia. *Can. J. Neurol. Sci.* 11: 124-128.
225. McGeer, G.E. et al. (1984): Neurotransmitter in the Basal Ganglia. *Can. J. Neurol. Sci.* 11: 89-99.