

00377

17



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDANTE EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATAS ADMINISTRADAS INTRAESTRIATALMENTE CON ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO, ÁCIDO QUINOLÍNICO Y EN RATONES TRANSGÉNICOS COMO MODELOS EXPERIMENTALES DE LA COREA DE HUNTINGTON

193051

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Director de tesis: DR. ABEL SANTAMARÍA



México, DF.

REGISTRACION POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ciudad Universitaria, D.F. a 8 de mayo de 2001.

Ana Erika Rodríguez Martínez

de cuenta: 93549033

de expediente: 3991106

PRESENTE

Por la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del 7 de mayo de 2001, aprobó el Jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental)** del Posgrado en Ciencias Biológicas, integrado de la siguiente manera:

Presidente: **Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez**

Secretario: **Dr. Abel Santamaría del Angel**

Vocal: **Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**

Suplente: **Dr. Federico Martínez Montes**

Suplente: **Dr. Juan Fernández Ruiz**

Sin más por el momento, me despido.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

C. c. p. Miembros del Jurado.

C. c. p. Expediente del Alumno.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis Dr. Abel Santamaría del Ángel por todo su apoyo y dedicación a mi trabajo.

A mis sinodales, por sus comentarios tan valiosos para el desarrollo de esta tesis: Dr. Juan Fernández Ruiz, Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, Dr. Abel Santamaría del Ángel y en especial al Dr. Federico Martínez Montes y al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y neurociencias, CINVESTAV.

Al Laboratorio Del Dr. Pedraza en especial a Perla de la Facultad de Química UNAM.

Al laboratorio de Neuromorfología del INNN a Juanita y Maricela.

Al Departamento de Patología del INNN especialmente a Conchita.

Y Al Departamento de Neuroquímica a Laura especialmente.

Al CONACYT proyecto J28612-M y al proyecto 31061-M.

A Alberto por su amistad y confianza.

A la Facultad de medicina, UASLP

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios por estar siempre cerca de mi.

A mi Papá de quien siempre he recibido un apoyo incondicional.

A mi mamá y amiga que en todo momento esta conmigo.

A ambos por todos sus sabios consejos, su confianza, el amor que siempre me han dado y por su eterna paciencia.

A Ricardo quien me ha brindado la oportunidad de conocer nuevos horizontes, por su confianza, su amor, por toda su ayuda y apoyo, por ser lo que ha sido en todo este tiempo.

A Miguel quien siempre se preocupa por mi y de quien he aprendido tanto.

A Alfre que siempre esta dispuesto a escuchar y a darme su apoyo.

A mi super hermana Gabi mi mejor amiga y la niña más especial de quien he recibido mucho.

Abreviaturas.

Especies Reactivas del Oxígeno	ROS
Enfermedad de Huntington	EH
Ácido 3-Nitropropiónico	3-NP
Ácido Quinolínico	QUIN
Sistema Nervioso Central	SNC
Superoxido Dismutasa dependiente de Manganeseo	Mn-SOD
Superoxido Dismutasa dependiente de Cobre/Zinc	Cu/Zn-SOD
Glutación Peroxidasa	GPx
Glutación Reducido	GSH
Succinato Deshidrogenasa	SDH
γ -aminobutírico	GABA
N-metil-D-aspartato	NMDA
Descarboxilasa del Ácido Glutámico	GAD
Colina Acetil-Transferasa	CAT

ÍNDICE

I.- RESUMEN.....	2
II.- ANTECEDENTES.....	3
2.1.- ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	3
2.2.- MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	10
2.2.1.- ADMINISTRACIÓN DEL ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO COMO MODELO DE EH.....	13
2.2.2.- ADMINISTRACIÓN DEL ÁCIDO QUINOLÍNICO COMO MODELO DE EH.....	18
2.2.3.- RATONES TRANSGÉNICOS COMO UN MODELO DE EH.....	23
2.3.- MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	25
2.3.1.- PEROXIDACION DE LÍPIDOS.....	26
2.3.2.- GLUTATIÓN.....	28
2.3.3.- GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	31
2.3.4.- SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	32
III.- OBJETIVOS.....	34
IV.- HIPÓTESIS.....	35
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
VI.- RESULTADOS.....	47
6.1.- Efecto de la administración intraestriatal de QUIN y 3-NP sobre la peroxidación de lípidos en ratas.....	47
6.2.- Efecto de la administración intraestriatal de QUIN y 3NP sobre los niveles estriatales de GSH.....	48
6.3.- Efecto de la administración intraestriatal de QUIN y 3-NP sobre la actividad enzimática de GPx.....	49
6.4.- Efecto de la administración intraestriatal de QUIN sobre la actividad enzimática de SOD-Mn y SOD-Cu/Zn, a las dos horas después de su inyección.....	50
6.5.- Efecto de la administración de 3-NP sobre la actividad enzimática de Mn-SOD a tres y seis horas después de su inyección.....	51
6.6.- Efecto de la administración intraestriatal de 3-NP sobre la actividad enzimática de Cu/Zn-SOD a tres y seis horas después de su inyección.....	52
6.7.- Actividad enzimática de Mn-SOD en estriado de ratones transgénicos para EH.....	53
6.8.- Actividad de Cu/Zn-SOD en estriado de ratones transgénicos para EH.....	54
6.9.- Descripción ultraestructural.....	55
VII.- DISCUSIÓN.....	56
VIII.- CONCLUSIONES.....	62
IX.- REFERENCIAS.....	64
X.- ANEXO.....	78

I. RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria autosómica dominante; se caracteriza por movimientos coreiformes, deficiencia cognitiva y manifestaciones psiquiátricas asociadas con una progresión de la atrofia estriatal. El defecto genético se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 4, en el gen llamado IT15 y consiste en el alargamiento de repetidos del triplete de CAG en la región codificante 5'. Esta enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia en personas de mediana edad (30-45 años). Para el estudio de EH se han utilizado modelos experimentales. Estos modelos son capaces de reproducir características bioquímicas e histopatológicas observadas en los pacientes. Dentro de estos modelos encontramos a aquellos que induce los ácidos 3-Nitropropiónico y quinolinico. La EH se ha relacionado con un posible estrés oxidativo, el cual puede ser generado experimentalmente por la administración de excitotoxinas como el QUIN o 3-NP. Por otro lado, también se pueden observar mecanismos de estrés oxidativo en ratones transgénicos que expresan una expansión en la repetición en los tripletes de CAG. En este trabajo se llevaron a cabo inyecciones intraestriatales de las toxinas antes mencionadas a ratas, para encontrar posibles alteraciones en algunos índices de estrés oxidativo. Para esto se evaluaron el índice de peroxidación lipídica, cambios en la actividad de glutatión peroxidasa (GPx), GSH estriatal y cambios en la actividad enzimática de ambas isoformas de la SOD (Mn-SOD y Cu/Zn-SOD). Esto último se realizó tanto en los modelos farmacológicos como en el modelo transgénico; y por último se evaluaron los cambios ultraestructurales de la mitocondria en ambos modelos. Se observó que ambas toxinas aumentan la lipoperoxidación estriatal a 3 horas toxinas, pero no así a las 6 horas en que solo aumentó en el caso del 3-NP. Se encontró una disminución de GSH a las 6 horas después de la administración de ambas toxinas pero sólo el QUIN produjo una disminución a las 3 horas. Para GPx, no se encontraron cambios significativos en la actividad de esta enzima, solo para el caso de 3-NP a 3 horas en que se produjo un aumento. No se encontraron cambios en la Mn-SOD a las 2 horas para el tratamiento con QUIN, pero si se encontró una disminución significativa de la Cu/Zn-SOD a este tiempo. Se observó una disminución significativa de Mn-SOD y de Cu/Zn-SOD a 3 y 6 horas con 3-NP. La actividad de la Mn-SOD se encontró aumentada en ratones transgénicos de 35 mientras que a las 19 semanas permanece sin cambio. La actividad de Cu/Zn-SOD se ve aumentada a las 19 semanas y disminuida significativamente a las 35 semanas. A nivel ultraestructural, para los tratamientos con QUIN no se observaron alteraciones mitocondriales evidentes, al igual que en ratones transgénicos de 19 semanas de edad. Sin embargo para 3-NP y ratones transgénicos de 35 semanas se observó hinchamiento mitocondrial y pérdida de sus crestas. Los resultados obtenidos sugieren que los modelos utilizados generan alteraciones en ciertos marcadores de estrés oxidante y que tal vez podrían representar algunas alteraciones patológicas de EH, involucrando posiblemente la producción de radicales libres generados por la sobreexcitación de receptores glutamatérgicos, generalmente receptores tipo NMDA, produciendo mecanismos de daño celular que explicarían patrones de muerte celular apoptótica y necrótica involucrada en EH. La alteración de la ultraestructura mitocondrial sugiere alteraciones energéticas en dichos modelos.

II. ANTECEDENTES

2.1. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno hereditario autosómico dominante; presenta desórdenes neurológicos caracterizados por movimientos coreiformes e involuntarios, deficiencia cognitiva y manifestaciones psiquiátricas asociadas con una progresión en la atrofia estriatal.

El defecto genético se encuentra localizado en el gen llamado ITIS, en el brazo corto del cromosoma 4, y consiste en el alargamiento de repetidos del triplete de CAG en la región codificante 5' (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

La prevalencia clínicamente identificada es cercana a 1/10,000 en algunas ciudades europeas y en ciudades pobladas con inmigrantes europeos.

Los síntomas clínicos generales se pueden dividir en tres partes: a) síntomas motores iniciando característicamente por hiperkinesia, pasando posteriormente a una hipokinesia;

b) desórdenes psiquiátricos con agresividad y depresión, y c) profundos cambios cognitivos.

Esta enfermedad afecta a jóvenes adultos (30-40 años de edad) quienes están integrados a una vida profesional y familiar. La enfermedad presenta una evolución de 17 años aproximadamente, asociada con demencia por lo que los pacientes requieren de constantes cuidados debido a su baja autonomía (Bruyn, 1968; Harper, 1991; Kremer et al., 1992).

Entre las manifestaciones neuropatológicas de EH se encuentra una degeneración progresiva del cuerpo estriado y del globus pallidus (Vonsattel et al., 1985). Esta enfermedad está categorizada dentro de cinco diferentes grados; Grado 0: patología no estriatal definida como manifestaciones clínicas premortem y una historia familiar positiva; Grado 1: pérdida neuronal limitada y una astrogliosis detectable por microscopia de luz; Grado 2: atrofia de núcleo caudado

con interfase convexa entre esta estructura y el ventrículo cerebral lateral; Grado 3: atrofia del caudado y putamen; Grado 4: severa atrofia de caudado-putamen, núcleo acumbens con interfase cóncava entre el núcleo caudado y el ventrículo lateral. El grado de atrofia del estriado se ha encontrado correlacionada con la severidad de los síntomas motores y psiquiátricos (Myers et al., 1988).

De forma interesante, no todas las neuronas estriatales son igualmente afectadas por el proceso degenerativo. Combinando estudios inmunocitoquímicos con análisis neuroquímicos, se ha observado que la EH afecta preferencialmente a las neuronas espinosas GABAérgicas de tamaño medio, pero otras subpoblaciones de células estriatales no se afectan en el curso de la enfermedad (Kowall et al., 1987; Cicchetti et al., 1996).

Todos los marcadores asociados con la integridad de las neuronas GABAérgicas (sustancia P, metionina-encefalina, niveles de GABA) se encuentran disminuidos en el cuerpo estriado de pacientes que presentan la enfermedad de Huntington (McGeer y McGeer, 1976b; Bird y Iversen., 1977; Spokes., 1980; Buck et al., 1981; Aronin et al.; Beal et al., 1988a; Storey y Beal., 1993; Beal., 1994). Se ha reportado que la concentración de GABA (γ -amino butírico) disminuye hasta un 60% en el cuerpo estriado, pero no en la corteza frontal o en el cerebelo de pacientes con EH. La actividad de la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), enzima que sintetiza al GABA, disminuye en el cuerpo estriado y permanece normal en la corteza frontal (Bird, 1974). La reducción del 50% o más del GABA y de la actividad de la GAD ha sido interpretada como una degeneración de las neuronas espinosas estriatales de tamaño medio que contienen al GABA (Spokes, 1979). La disminución en la concentración de GABA estriatal ha sido relacionada con la vía aferente del cuerpo estriado a la sustancia nigra y al globus pallidus (Bird, 1974).

La actividad de la colina acetil-transferasa (CAT), la enzima encargada de la síntesis de la

acetil-colina, también disminuye, como consecuencia de la degeneración de las interneuronas colinérgicas estriatales (Aquilonius, 1971).

La sustancia P, un neuropéptido encontrado en los ganglios basales, se ha postulado como un neurotransmisor excitador de la vía aferente del estriado a la sustantia nigra. En la EH, la concentración de sustancia P en el glubus pallidus y la sustantia nigra disminuye hasta en un 90%, en el núcleo caudado disminuye en un 50% y en la zona compacta de la sustancia nigra se observa un tercio de la concentración normal, afectando la pars reticulata y la pars compacta mientras que en el líquido cefalorraquídeo permanece normal (Gayle, 1978). Se han observado pequeños cambios en la concentración de la dopamina estriatal, sugiriéndose que esto puede deberse inicialmente a la pérdida de tejido en el cuerpo estriado atrofiado, o bien, a factores como la pérdida de fibras GABAérgicas aferentes del estriado a la sustantia nigra, provocando además una pérdida retrógrada de dopamina de las terminales dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal (Carrasco y Mukherjiu, 1986; Bird, 1990). Se ha propuesto adicionalmente que la hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales trae como resultado un incremento en la síntesis y liberación de dopamina sobre los receptores dopaminérgicos. Esto podría deberse a una inhibición reducida del sistema dopaminérgico estriatal por la degeneración de la vía metabólica del GABA, aunque algunos estudios con cerebros de pacientes con la EH y cerebros de animales lesionados con ácido kaínico utilizado como modelo de la EH muestran que las proyecciones nigro-estriatales se adaptan a la pérdida de neuronas estriatales que normalmente inhiben la actividad dopaminérgica (Melamed y et al., 1982).

La mutación genética responsable de la EH se ha identificado como una expansión del repetido CAG presente en el gen y expresado como una proteína llamada huntingtina con un peso de 350 kDa (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Un número de repetidos

de CAG de menos de 36 se considera como un fenotipo normal mientras que un número de repetidos de CAG mayor de 36 se ha asociado con el desarrollo de la enfermedad durante la vida adulta. Se ha encontrado que en la vida adulta, de 30-35 años de edad, el número de repetidos de CAG varían alrededor de los 50 repetidos. Un número de 100 repetidos de CAG se ha relacionado con la enfermedad de Huntington juvenil (Illarioshkin et al., 1994; Snell et al 1993).

Al parecer la transmisión paterna de la EH, indica que probablemente un gran número de divisiones mitóticas en la espermatogénesis podrían ser responsables de la inestabilidad de los repetidos (Gusella, 1993). El RNAm del gen IT15 es expresado normalmente en todas las células del cuerpo, por lo que la expresión del RNAm y de la proteína no cambia en pacientes con EH (Gourfinkel, 1997). En el cerebro, la expresión de IT15 es marcadamente neuronal, con solo bajas concentraciones en glía.

La localización de la huntingtina es algo controversial (Hoogeveen et al., 1993), ya que en estudios de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra el carbono terminal de la huntingtina, se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas de pacientes con EH. En el tejido de los órganos periféricos fue localizada sólo en el citoplasma. DiFiglia y col. (1995), también utilizaron inmunohistoquímica en cerebro humano y encontraron huntingtina en el citoplasma del soma neural, dendritas y axones. Resultados recientes demuestran que la huntingtina mutada está sólo presente en neuronas periféricas y en procesos nerviosos proximales pero no en nervios desenlazados (Gourfinkel-An et al., 1997), lo que sugiere una expresión anormal de la huntingtina mutante en estos sitios. Usando gradientes de sacarosa, DiFiglia y col. (1995) revelaron que la huntingtina se encuentra en las fracciones enriquecidas de vesículas, donde la huntingtina se sobrelapa con la distribución de vesículas de proteínas membranales como el receptor de transferrina y sinaptoficina. También se ha

demostrado que la huntingtina está asociada con los gránulos citoplasmáticos, pareciéndose a los cuerpos multivesiculares, e implica a los organelos en el transporte retrógrado y la degradación de las proteínas en algunas neuronas estriatales y corticales de la EH (Sapp et al., 1997).

Otros estudios indican que la huntingtina está asociada con los microtubulos, lo que podría indicar que tiene una función en el tráfico de las vesículas. Al parecer, tanto la forma mutante como la huntingtina normal se encuentran asociadas con las vesículas cubiertas por clatrina de la red de Golgi, el citoplasma y la membrana plasmática (Guterkunst, 1995). En el estudio de la interacción de las proteínas con la huntingtina se ha observado que la expansión de las poliglutaminas en la huntingtina mutada puede modificar la interacción normal de la huntingtina con otras proteínas o puede producir nuevas interacciones con otras proteínas, y en ambos casos llevar a la muerte neuronal. En términos de interacción proteína-proteína, es posible que la expansión del repetido CAG afecte la estructura cuaternaria de la proteína, y también muchos dominios de la huntingtina mutada podrían involucrar nuevas interacciones a través del dominio N-terminal, incrementando el número de posibles interacciones entre proteínas con la proteína normal o mutada. Una de estas proteínas es la apopainina, también llamada caspasa 3 o CPP32; es una cisteín-proteasa que está involucrada en la regulación de la muerte celular programada (apoptosis) durante el desarrollo del cerebro (Kuida et al., 1996; Shwartz y Milligan, 1996). Se ha visto que la huntingtina, tanto *in vivo* como *in vitro*, es un buen sustrato para la apopainina (Goldberg et al., 1996b). El número de residuos de poli-glutaminas parece influir en la actividad catalítica de la caspasa 3 para la huntingtina y la actividad proteolítica de la enzima se incrementa en presencia de la huntingtina mutada; si esto ocurre en la EH, un incremento en la degradación de la huntingtina puede producir un incremento en la formación de fragmentos N-terminal en el cerebro de los pacientes EH y finalmente un incremento en la toxicidad inducida por el fragmento

N-terminal. Otra interacción huntingtina-proteína incluye a proteínas implicadas en el metabolismo energético, el grupo N-terminal de la huntingtina interactúa con la enzima de la glucólisis GADPH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Burke et al., 1996). En un estudio utilizando inmunoprecipitación se muestra que la interacción de la GADPH con la huntingtina se incrementa más por la presencia de la expansión de la poli-glutamina (Burke et al., 1996). La interacción de la GADPH con la huntingtina mutada puede dañar la actividad glucolítica de esta enzima y progresivamente comprometer la energía, e indirectamente provocar la excitotoxicidad. Otra proteína, la Proteína asociada a huntingtina 1 (HAP1) es una proteínas específica de cerebro que interactúa con elementos de citoesqueleto, está a su vez interactúa con la huntingtina: la potencia de esta interacción comienza con el incremento de la expansión de poli-glutaminas (Li et al., 1995). La co-localización parcial de la HAP1 con la sintasa del óxido nítrico (NOS), una enzima implicada en la excitotoxicidad, sugiere una interacción anormal entre la huntingtina y esta proteína que podría producir la muerte de neuronas estriatales mediada por NO en pacientes con EH (Li et al., 1996).

La expansión de los repetidos de poli-glutaminas disminuye la interacción entre la huntingtina y HIP1 y esto puede llevar a una desorganización general del citoesqueleto neuronal, posiblemente desencadenando cambios en la ATPasa de la membrana plasmática o una deficiencia en el transporte de organelos, incluyendo la mitocondria y finalmente el daño energético e indirectamente la excitotoxicidad (Liu et al., 1997).

Se ha observado una distribución heterogénea de la huntingtina dentro de las neuronas del estriado humano normal (Ferrante, 1997). La inmunoreactividad para la huntingtina es vista principalmente en la región de la matriz con pequeñas señales en las regiones de parches. Existiendo una mayor pérdida de las neuronas positivas a calbindina en la región de la matriz.

Estudios recientes han demostrado una correspondencia entre la presencia de la calbindina y la huntingtina, con sólo una pequeña coexpresión de la huntingtina, NADPH diaforasa y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Ferrante, 1997), lo que sugiere que la vulnerabilidad selectiva de neuronas espinosas de dimensión media en el compartimiento de la matriz del estriado está condicionada por los niveles altos de expresión de la huntingtina, ya que la relativa resistencia de las neuronas espinosas de dimensión media y larga en el compartimiento de parche del estriado está asociada con bajas concentraciones de huntingtina.

2.2. MODELOS EXPERIMENTALES DE COREA DE HUNTINGTON

Se han propuesto diversos modelos experimentales que han sido relevantes para el estudio de la EH (Beal et al., 1986; Coyle et al., 1976; Greene et al., 1995). La excitotoxicidad y el estrés oxidativo son dos condiciones que provocan la muerte celular asociada con algunas enfermedades neurodegenerativas (Coyle et al., 1993). Estos dos procesos pueden ser parte de un círculo vicioso y constituirse como iniciadores o contribuir a un daño en la función mitocondrial, y eventualmente producir una falla energética de la célula (Beal., 1992; Beal et al., 1993). En años recientes se ha puesto mayor atención a la apoptosis como ruta de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas y se ha sugerido una importancia directa de este proceso en la destrucción de las células estriatales en la EH (Portera-Cailliau et al., 1995).

La excitotoxicidad fue descrita en 1969, como la descripción de un efecto neurotóxico de los aminoácidos excitadores, con la destrucción de neuronas en el sitio de la inyección (Olney. 1969). La excitotoxicidad juega un papel importante en la EH. Las primeras observaciones de excitotoxicidad ligadas con la EH aparecieron en 1976, cuando se observó que después de una inyección intraestriatal de ácido kainico, agonista de una subclase de receptores glutamatérgicos (Kainato) a ratas, estas sufrían lesiones similares a las observadas en la EH (Coyle et al., 1976; McGreer et al., 1978).

En el sitio de la inyección en estriado hay disminución neuronal de fibras aferentes, componentes no neuronales y una gran cantidad de interneuronas. Esto sugiere que el glutamato juega un papel central en la patogénesis de la EH. Se han identificado algunas clases de receptores a glutamato y se dividen comúnmente en ionotrópicos (canales iónicos controlados por receptores) y metabotrópicos, (acoplados a proteínas G). Los receptores ionotrópicos son: a) el

receptor para N-metil-D-aspartato (NMDA), que es sensible al NMDA y al ácido quinolínico, b) receptor a α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), sensible al AMPA y a ácido kaínico, y c) los receptores a Kainato sensibles al ácido kaínico y al ácido quisquálico (Doble., 1995; Lipton et al., 1994). La activación de los receptores del tipo NMDA inicia un aumento en la permeabilidad a los iones calcio y sodio.

Por otro lado, los derivados del oxígeno altamente reactivos conocidos como radicales libres, cuando están presentes en exceso llevan a una situación conocida como estrés oxidativo (Dugan et al., 1995), y esto puede ser consecuencia de un mal funcionamiento de la mitocondria (Schulz et al., 1995) o de la excitotoxicidad (Beal., 1995). El incremento del calcio intracelular puede activar a la fosfolipasa A2 (PLA2) y proteasas dependientes de calcio. La fosfolipasa A2 a su vez incrementa la producción de ácido araquidónico y el subsecuente metabolismo del ácido araquidónico induce la formación de radicales libres. El peróxido de hidrógeno y el superóxido son formados a través de la activación de estas proteasas dependientes de calcio, y además, el peróxido de hidrógeno puede ser convertido a radical hidroxilo, contribuyendo así a la neurotoxicidad. El daño al metabolismo energético reduce el umbral para la toxicidad del glutamato (Noveli et al., 1988), y puede favorecer la activación de los mecanismos excitotóxicos (Beal., 1992), así como el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Coyle et al., 1993) (Figura 1).

Para generar modelos de EH se utilizan algunos fármacos tales como el ácido quinolínico o como el ácido 3-nitropropiónico, entre otros, y actualmente un modelo transgénico está siendo utilizado.

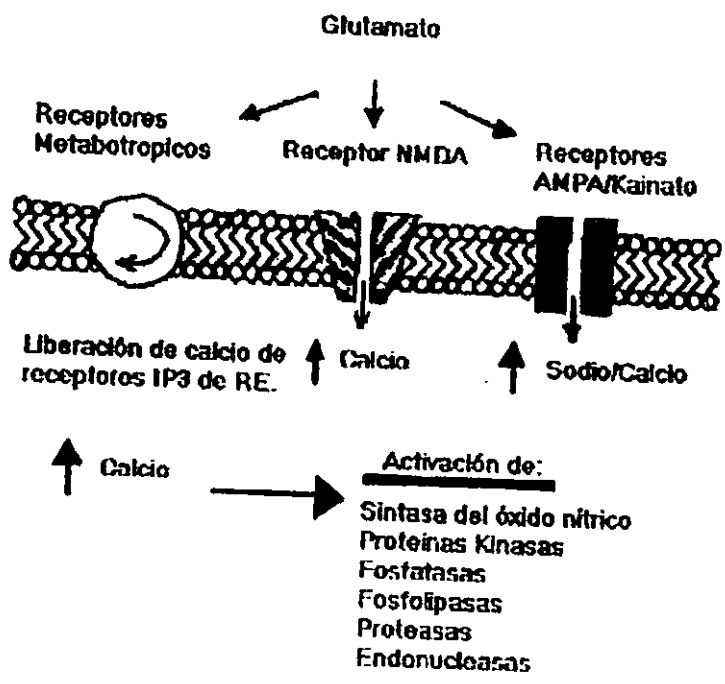


Figura 1. Toxicidad del glutamato. (Tomado de Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Disease. M. Flint y col., 1997).

2.2.1. ADMINISTRACIÓN DEL ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO COMO MODELO DE LA EH

La identificación inicial del ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (Figura 2), fue como un metabolito del 3-nitropopanol, agente tóxico responsable del envenenamiento del ganado en la zona occidental de Estados Unidos. Los animales intoxicados con plantas de leguminosas (*Indigofera* o *Astragalus*) presentan anomalías motoras consistentes en debilidad general (Ludolph et al., 1991).



Figura 2. Estructura química del 3-NP

Hace algunos años se reportó la ingesta de azúcar de caña contaminada con un hongo (*Arthrinium*), que produce altos niveles de 3-NP y fue el responsable del desarrollo de encefalopatías agudas en humanos (Ludolph et al., 1991). Entre 1972 y 1989, se reportaron cerca de 900 casos de intoxicación: el 10% de ellos murieron y muchos otros presentaron pérdida de habilidades motora de forma irreversible. Un número sustancial de sujetos desarrollaron un daño neurológico persistente caracterizado por distonia, espasmos, gesticulaciones y movimientos

bruscos o de sacudidas; se ha señalado la presencia de lesiones en los ganglios basales, con daño en el putamen y el núcleo caudado. Un reporte de intoxicación por 3-NP en China confirma las observaciones previas (He et al., 1995). El primer estudio controlado en animales fue realizado por Gould y colaboradores (Goul y Gustine, 1992; Gould et al., 1985; Hamilton y Gould 1987, 1987b) quienes observaron que la inyección del 3-NP a primates no humanos produce lesiones cerebrales, que afectan preferencialmente a los ganglios basales.

El 3-NP es un inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), inhibiendo tanto el ciclo de Krebs como el complejo II de la cadena transportadora de electrones (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979). La succinato deshidrogenasa es una enzima responsable de la oxidación del succinato a fumarato (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979).

El mecanismo preciso de la inactivación de la SDH no es claro, sin embargo, Alston en 1977 sugiere que el dianión formado por el 3-NP es la forma inhibitoria de la molécula y esta forma el carbanión que puede reaccionar con el grupo flavín de la SDH como un aducto covalente. Coles y col., en 1979, cambian esta hipótesis y demuestran que el carbanión del dianión forma la unión en el sitio del sustrato para ser oxidado a 3-nitroacrilato, que puede reaccionar con un grupo tiol del mismo sitio, formando un aducto covalente. (Figura 3).

El 3-NP al inhibir a la SDH, produce una disminución en la síntesis de ATP que a su vez provoca una despolarización de la membrana con la subsecuente activación de receptores de tipo NMDA sensibles a voltaje y una excitotoxicidad neuronal secundaria (Novelli y col., 1988). En la fase inicial de la intoxicación, el 3-NP inhibe selectivamente el ciclo del ácido cítrico de las neuronas GABAérgicas; la actividad glial permanece inalterada durante este tiempo (Hassel y Sonnewald, 1995). Estos resultados pueden explicar por qué las neuronas del caudado/putamen (las cuales son fundamentalmente GABAérgicas), son dañadas selectivamente por el 3-NP. Al

parecer, la excitotoxicidad subsecuente induce una muerte necrótica o apoptótica (Figura 4). Existen evidencias bioquímicas y morfológicas que sugieren que existe apoptosis en el estriado después de una administración sistémica de 3-NP (Sato et al, 1997). Por otro lado, el antagonista de los receptores del tipo NMDA, el MK-801, no protege en contra de la toxicidad del 3-NP en cultivos de neuronas corticales y estriatales, y la morfología de la muerte celular fue indicativa de un mecanismo apoptótico (Behrens et al., 1995). La muerte apoptótica fue bloqueada por cicloheximida, pero no por antagonistas de NMDA, y esto demuestra que el 3-NP puede provocar una muerte necrótica rápida que involucra a los receptores NMDA, o una muerte apoptótica lenta independiente de los receptores a NMDA; sin embargo, aún no se ha explicado el daño regional específico producido por la administración sistémica de 3-NP (Geddes et al., 2000).

Otros estudios han reportado disminuciones en el metabolismo de la glucosa y anomalías en las enzimas transportadoras de electrones en las mitocondrias de cerebros de pacientes con EH (Beal y col., 1992). La administración sistémica crónica de 3-NP también produce lesiones que presentan características histológicas y neuroquímicas parecidas a la EH. El 3-NP inyectado intraestriatalmente a ratas y primates no humanos, produce lesiones dependientes de la dosis con pérdida neuronal y gliosis. Se observa una disminución de ácido γ -aminobutírico (GABA), sustancia P, somatostatina, neuropéptido Y y dopamina. Las lesiones ocasionadas producen un decaimiento del ATP a las tres horas después de la inyección, el cual llega a persistir hasta 24 horas después (Beal. 1993). Recientemente se ha obtenido evidencia de la participación del metabolismo oxidativo en la EH: usando imágenes de resonancia magnética se ha observado acumulación de lactato en los ganglios basales (Koroshetz y col., 1992). El 3-NP, por las características de las lesiones que produce, es un importante inductor del modelo de EH para evaluar posibles terapias experimentales (Beal y col., 1993).

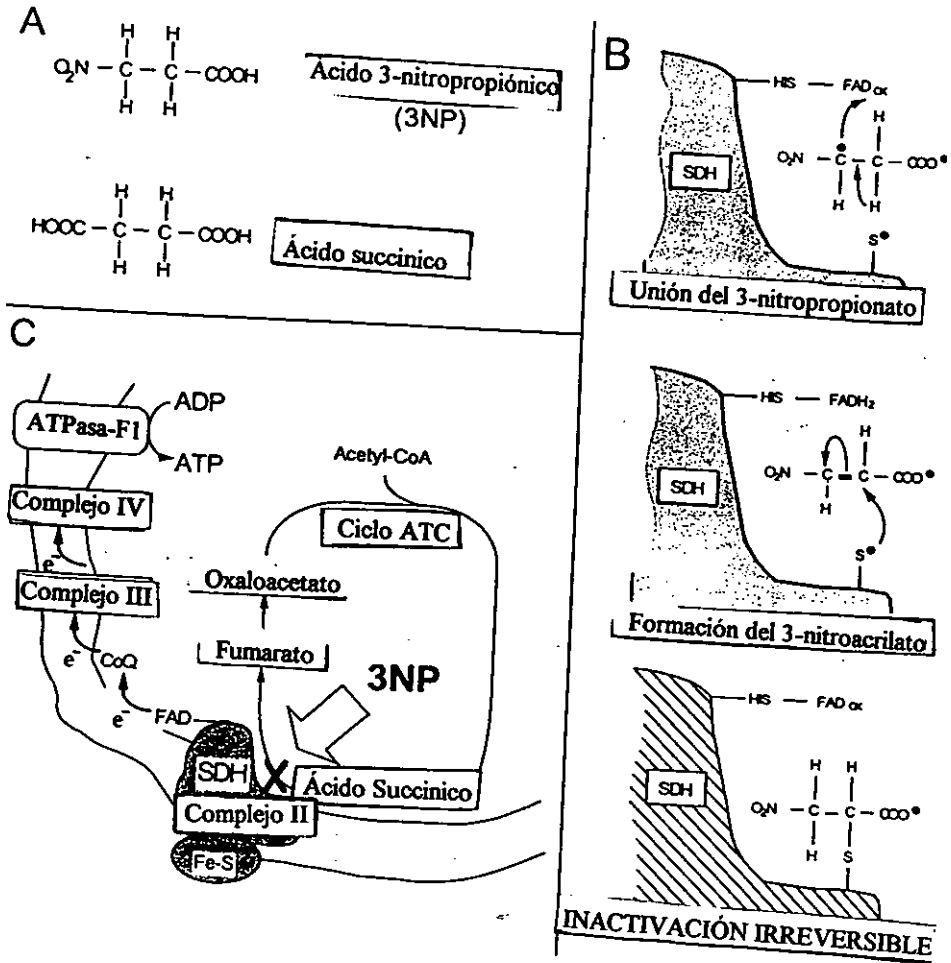


Figura 3. 3-NP como inhibidor irreversible de la SDH (Tomado de Brouillet y col., 1999)

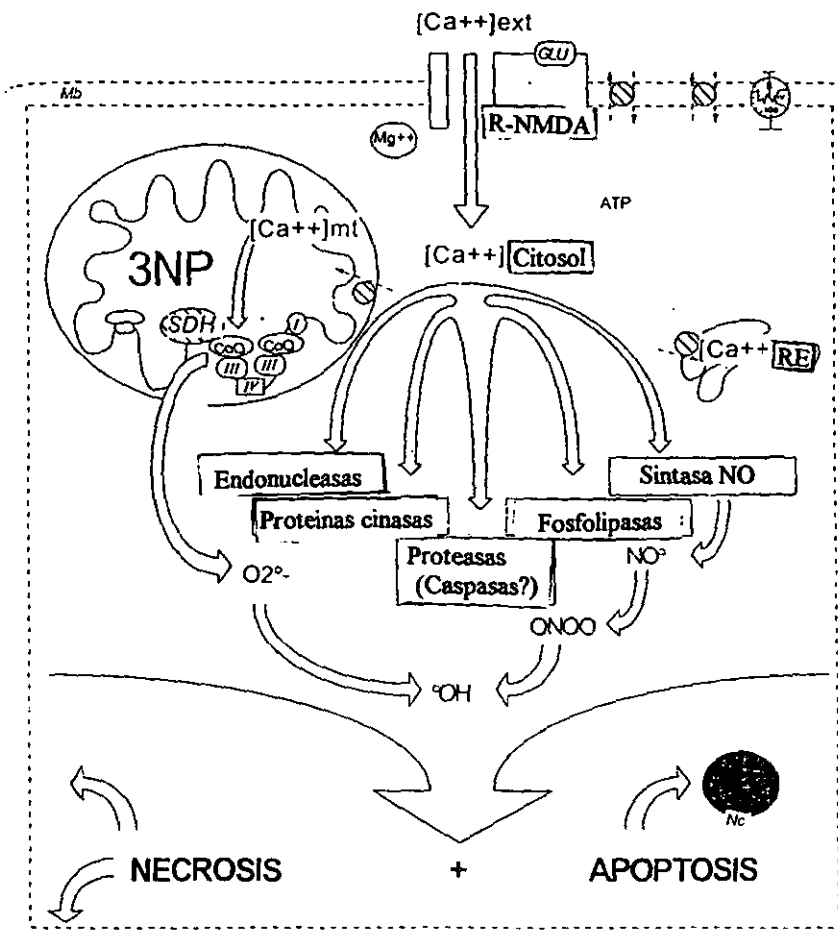


Figura 4. Representación esquemática de la cascada de excitotoxicidad generada por 3-NP
 (Tomado de Brouillet y col., 1999).

2.2.2. ADMINISTRACIÓN DEL ÁCIDO QUINOLÍNICO COMO MODELO DE LA EH

Otro de los fármacos más utilizado como modelo para el estudio de la enfermedad de Huntington es la administración estriatal del ácido quinolínico (QUIN) (Figura 5). Las propiedades excitotóxicas que presenta el QUIN se acentúan por su naturaleza endógena, estando disponible para las funciones fisiopatológicas del SNC y causando una muerte neuronal selectiva (Schwarcz et al., 1984).

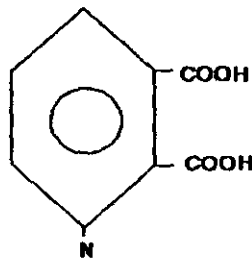


Figura 5. Estructura química del QUIN.

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico) es un metabolito endógeno del L-triptofano que se forma en la vía de la kinurenina (Vender, 1975) y presenta actividad como agonista de los receptores glutamatérgicos para NMDA (Stone, 1993).

La vía metabólica de la kinurenina (Figura 6) ha sido identificada en el cerebro, el hígado y en los intestinos humanos (Vender, 1975; Wolfensberger, 1983; Moroni, 1984^a).

El QUIN fue localizado por primera vez en el tejido cerebral de la rata y de los humanos (Wolfensberger y col., 1984), se encuentra preferencialmente acumulado en la corteza cerebral, el cuerpo estriado, el hipocampo, el diencéfalo, el cerebelo y tallo cerebral de varias especies de mamíferos. Las concentraciones del QUIN no varían grandemente en las diferentes regiones del cerebro y en la mayoría está presente en concentraciones micromolares. Así, la corteza cerebelar (con aproximadamente 2 nmol/g de tejido) generalmente tiene niveles de 2 a 4 veces más altos que los presentes en el estriado (Wolfensberger, 1983; Moroni, 1984a).

Su concentración aumenta con la edad y se ha comprobado que en los animales de edad avanzada, las concentraciones de QUIN en el cerebro llegan a ser elevadas (Moroni y col., 1984), lo cual sugiere que el QUIN podría estar asociado con procesos de envejecimiento celular tales como el daño oxidativo y la apoptosis (Stone, 1993). Por la localización de las enzimas de síntesis del QUIN, la 3-hidroxi-antranilato-oxigenasa (3-HAO) y de degradación, la QUIN-fosforribosil-transferasa (QPRT), se cree que el papel fisiológico de este metabolito podría estar relacionado con su actividad como neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC) (Stone, 1993).

Por otra parte, el ácido quinolinico presenta una baja capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que se cree que su contenido en el cerebro es originado endógenamente a partir de la vía de la kinurenina (Foster y col., 1984). De forma interesante, el cuerpo estriado no cuenta con los mecanismos de degradación del QUIN en el espacio extracelular por carecer de la QPRT u otras enzimas de degradación de este metabolito (Stone, 1993), lo cual podría explicar la selectividad de los efectos tóxicos del QUIN sobre dicha región cerebral.

El QUIN produce neurotoxicidad por la sobre-estimulación de los receptores de tipo NMDA (Perkins, y Stone., 1983; Schwarcz et al., 1983). La microinyección del QUIN dentro de algunas regiones del SNC produce lesiones que son atenuadas por un gran número de antagonistas de los receptores de tipo NMDA (Foster et al., 1988; Foster et al., 1984; Schwarcz et al., 1983). Hoy se sabe que las neuronas específicas de varias regiones del SNC exhiben diferente sensibilidad al QUIN y al NMDA (Efrench-Mullen et al., 1986; Perkins y Stone., 1983; Schwarcz y Kohler., 1983), y se ha sugerido que el QUIN podría actuar sobre algún subtipo del receptor NMDA (Perkins y Stone., 1983). En este modelo, la mayoría de las neuronas degeneran de 4 a 5 días después de la inyección (Shwarcz et al., 1983; Foster et al., 1988), y solo un grupo pequeño de la población total de neuronas, aquellas que contienen la NADPH-diaforasa, son resistentes al daño (Schwarcz et al., 1983). También se ha observado en varias regiones cerebrales de pacientes con EH un incremento significativo de la actividad de la 3-hidroxiantranilato oxigenasa (la enzima de síntesis del ácido quinolínico) (Schwarcz, 1988).

Además, las inyecciones del QUIN inducen un incremento del contenido de calcio intracelular, iniciando la liberación intracelular del calcio de depósitos intracelulares y la activación posterior de canales iónicos a través de los cuales sodio y calcio pueden pasar en grandes cantidades (Lu, 1991). La despolarización de la membrana da como resultado una activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales pueden admitir suficiente calcio como para contribuir al daño neuronal (Weiss, 1990). Cuando se administra directamente dentro del estriado de la rata, el QUIN produce lesiones tipo "axon sparing" o de axones preservados, con marcada pérdida de dendritas, vacuolización y pérdida de la estructura en los sitios postsinápticos, pero generalmente buena preservación de las terminales presinápticas. Resulta interesante que las áreas del cerebro más sensibles a su acción neurotóxica sean el hipocampo y el estriado. Otras áreas, incluyendo la

amígdala, el hipotálamo, la *substantia nigra* y el bulbo olfatorio, son más resistentes a la toxicidad del QUIN en el cerebro de rata (Schwarcz, 1983).

Beal y col. (1989) enfatizaron que en la EH, la preservación de algunas neuronas es sólo un aspecto relativo, y en los casos patológicos más severos, hay una pérdida de todos los tipos neuronales. En este punto cabe mencionar la existencia de marcadores adicionales de algunos grupos específicos neuronales, tales como la NADPH-diaforasa. Esta enzima se ha encontrado histoquímicamente en el SNC y se ha observado que las neuronas estriatales que contienen esta enzima se preservan selectivamente en la enfermedad (Ferrante et al., 1984), lo cual ocurre frecuentemente con la co-localización de la somatostatina y el neuropeptido Y. Desde hace algunos años se ha sugerido que las neuronas que contienen NADPH diaforasa son más resistentes a la toxicidad del QUIN (Kowall et al., 1987), y se han propuesto 2 teorías, una establece que la NADPH diaforasa es una sintasa del óxido nítrico, y por tal se encarga de proteger a las neuronas; o la segunda, que la NADPH diaforasa actúa como enzima citoplásmica o a nivel de las terminales nerviosas y que tiene como función capturar al QUIN y degradarlo en moléculas menos tóxicas para la neurona (Kowall et al., 1987).

En la década de los 90's, el QUIN adquirió gran importancia en el estudio de procesos patológicos del SNC, no sólo como modelo de la EH sino también en algunas alteraciones asociadas con otras enfermedades, como el complejo de demencia asociado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Heyes et al., 1989), en donde se cree que los altos niveles registrados de este metabolito en líquido cefalorraquídeo pueden estar asociados con la demencia y la atrofia cerebral observada en estos pacientes.

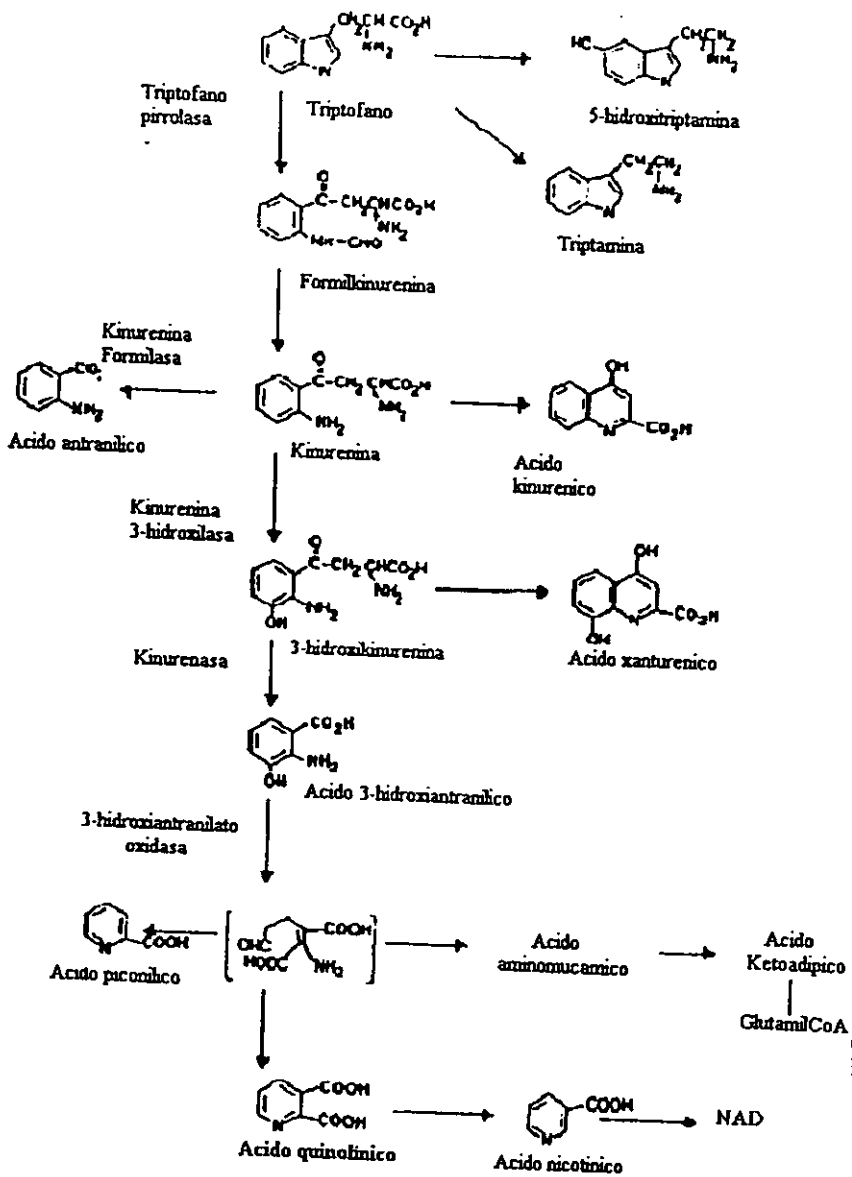


Figura 6. Vía metabólica de la Kinurenina (Tomado de Bruyn y Stoof, 1990).

2.2.3. RATONES TRANSGÉNICOS COMO UN MODELO DE LA EH

Tres grupos independientes crearon ratones knock-out del gen de EH (Naisir et al., 1995; Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). En todos los casos los embriones murieron, sólo un mutante fue asociado con un incremento en la actividad motora, deficiencia en el aprendizaje y pérdida neuronal significativa en los núcleos subtalámicos (Nasir yet al., 1995).

Varios ratones transgénicos se generaron después, usando una cadena larga de cDNA portadora de 44 repetidos del CAG (Goldberg y col., 1996a) o un exón del gen mutado de EH portador de 115-156 copias de CAG (Mangiarini et al., 1996). Una vez desarrollado el ratón transgénico llamado R6, se hicieron otras líneas de ratones transgénicos, con variaciones en el número de repetidos CAG. Las líneas R6/0, R6/1 y R6/2 contienen diferente número de repetidos de CAG (142, 116 y 144 respectivamente). También se han desarrollado ratones transgénicos con 18 repetidos, los que no muestran el fenotipo neurológico, indicando así la relación causal entre la expansión de glutaminas entra la proteína y la enfermedad (Mangiarini y col., 1996.).

Las líneas de ratones R6/0, R6/1 y R6/2 desarrollaron un fenotipo neurológico anormal. Gradualmente, los animales llegan a ser descoordinados desarrollando movimientos anormales y pérdida de peso corporal; conductualmente presentan un signo llamado feet clasping (Sujetan sus patas traseras con sus patas delanteras al quedar pendientes de su cola). Otra de las características de estos ratones es la observación de estructuras que aparecen en los núcleos, llamadas inclusiones intranucleares. Estas inclusiones se han encontrado también en el material de necropsia de los humanos y se ha postulado que tienen un papel en la patogénesis de la EH (Davies et al., 1997; Difiglia. 1997). Las inclusiones intracelulares y citoplásmicas en los pacientes con la EH están compuestas de fragmentos N-terminales truncados de la proteína huntingtina que son detectados por medio de anticuerpos policlonales dirigidos contra una fusión

de la proteína CAG53b o del péptido HP1 correspondiente a una secuencia N-terminal de la huntingtina (Sieradzan, 1999).

Estas inclusiones contienen la proteína huntingtina truncada en el punto del marco de lectura del sitio de segmentación de la caspasa (Wellington, 1998). De esta forma, en pacientes con expansiones largas del trinucleótido CAG, la segmentación proteolítica de la huntingtina mutante podría producir una acumulación temprana de los fragmentos neurotóxicos de la proteína y la formación de cuerpos de inclusión con degeneración de las neuronas afectadas a una edad temprana de inicio clínico de la enfermedad (Sieradzan, 1999). La membrana nuclear de las neuronas exhibe un incremento en el número de muescas que corresponden a un incremento en la densidad de poros nucleares (Davis, 1997). Las inclusiones contienen fragmentos NH₂ terminales de la huntingtina mutante, la cual es ubiquitinada.

Otro grupo propuso ratones con 71 y 94 repetidos de CAG estos no contienen inclusiones nucleares o exhiben algún déficit conductual, pero poseen un aumento en la sensibilidad de la activación de receptores glutamatérgicos en neuronas estriatales (Levine., 1998).

2.3. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno es esencial para el mantenimiento de la vida, su ausencia conduce rápidamente a la muerte celular y tisular. En contraparte la toxicidad del oxígeno es el resultado de la producción continua de especies altamente reactivas o radicales libres. Un radical libre se define como aquella especie que tiene uno o más electrones desapareados. Esta definición incluye al átomo de hidrógeno, las especies derivadas del oxígeno y especies generadas a partir de metales de transición, tanto el oxígeno como el peróxido de hidrógeno se consideran precursores de radicales libres (Halliwell, 1981). Si una molécula de oxígeno acepta un electrón, se forma un radical superóxido con un electrón desapareado.

En el organismo, varias enzimas catalizan la reducción univalente del oxígeno para dar lugar al radical superóxido. McCord y Fridovich (1969) descubrieron la enzima encargada de atrapar al radical superóxido en las células (la superóxido dismutasa o SOD) y concluyeron que este radical es el responsable de la toxicidad producida por el O_2 .

El estrés oxidativo se ha definido como la relación entre los mecanismos de producción de radicales libres y la baja efectividad de los sistemas de defensa antioxidante; el estrés actúa mediante diferentes mecanismos: a) la peroxidación de lípidos, b) la proteólisis peroxidativa, c) el daño a ácidos nucleicos (DNA y RNA) y d) el daño a los carbohidratos (Halliwell, 1990).

De acuerdo con Coyle y Puttfarcken (1993), el estrés oxidativo se encuentra relacionado con los desórdenes neurológicos tales como la epilepsia y los eventos traumáticos. El estrés oxidativo y la activación excesiva de los receptores a glutamato (AK, NMDA, AMPA), interactúan en los procesos de vulnerabilidad celular del cerebro (Coyle et al., 1993)

2.3.1. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La lipoperoxidación es una expresión del estrés oxidativo y se caracteriza por ser una reacción de autooxidación que puede ser iniciada por los radicales hidroxilo, pero no por radicales menos reactivos como son el superóxido o sustratos como el peróxido de hidrógeno.

La lipoperoxidación se caracteriza por cambios asociados con el deterioro oxidativo de aceites vegetales y grasas animales, que incluyen cambios en el color, la viscosidad y la solubilidad (Gutteridge., 1988). La lipoperoxidación aumenta la rigidez de la membrana celular y ésta puede disminuir la presencia de enzimas unidas a las membranas y de los receptores hormonales. Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación y el proceso se inicia por una reacción en cadena de radicales libres. La peroxidación es iniciada por el ataque de alguna especie química suficientemente reactiva como para sustraer un átomo de hidrógeno del sitio de la cadena (Gutteridge., 1990). Un punto esencial de la lipoperoxidación es que los ácidos grasos no saturados al ser degradados por este mecanismo, conducen a la producción del malondialdehído (MDA) como producto intermediario, el cual es extremadamente reactivo con grupos amino provenientes de proteínas y genera bases de Schiff que se pueden identificar por su característica de exhibir fluorescencia.

Se pueden observar tres pasos principales de la peroxidación de lípidos: 1) Iniciación: La iniciación de la reacción en cadena se localiza en el doble enlace de un ácido graso insaturado. El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), capta un átomo de hidrógeno para su transformación en agua. Los ácidos grasos insaturados víctimas de la agresión se transforman a su vez en radicales libres, con un rápido rearrreglo de sus dobles enlaces y, en presencia de oxígeno, forman un radical peroxi (ROO). 2) Propagación: El radical peroxi (ROO) desprendido actúa sobre una cadena insaturada vecina intacta con sustracción de un hidrógeno y la formación de un hidropéroxido ROOH

inestable, mientras que el radical ROO que se ha formado, puede comenzar un nuevo ciclo. Esta reacción en cadena, producto del ataque de los lípidos de membrana por los radicales libres, constituye la lipoperoxidación. Los hidroperóxidos son igualmente degradados, formando varios alcanos y aldehídos. Uno de los productos de degradación, el dialdehído malónico, puede reaccionar con los grupos tiol (SH) o amino (NH₂) de las proteínas y formar compuestos fluorescentes. Su consiguiente acumulación en forma de lipofuscina es característica de las células que sufren una peroxidación lipídica intensa y repetida; 3) Terminación: La reacción en cadena se detienen cuando dos radicales libres pertenecientes o no a la misma molécula, interactúan, creando entre ellos dos puentes. Esta es igualmente frenadas por el encuentro con moléculas captadoras, tales como el α - tocoferol de la membrana, o por los puentes que se establecen entre las proteínas de membrana y del dialdehído malónico (Clavel et al.,1985; Marodonneau et al., 1983).

2.3.2. GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) es un tripéptido presente en las células animales y está constituido por tres aminoácidos que son el glutamato, la cisteína y la glicina; estos aminoácidos son sintetizados en el organismo aunque también se obtienen a través de la dieta.

El GSH es un importante antioxidante celular. Fahey y Sundquist (1991) encontraron evidencia para ligar evolutivamente al GSH y al metabolismo eucarionte aerobio; esta relación indica que el GSH involucra moléculas de protección celular en contra de la toxicidad del oxígeno. El GSH es sintetizado en dos pasos a partir del glutamato, la cisteína y la glicina, que son catalizados por la γ -glutamilcisteína-sintetasa y la GSH sintetasa. El glutatión reducido (GSH) constituye un importante sistema para la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (Meister, 1994; Cooper y Cristal, 1997) (figura 6).

La inhibición de la síntesis de GSH incrementa la formación de radicales libres (Merad-Boudia et al., 1998), incrementa la actividad de síntesis del óxido nítrico (Heales et al., 1996) disminuye la función mitocondrial (Heales et al., 1995; Merad-Boudia et al., 1998), e incrementa la vulnerabilidad excitotóxica (Bridges y col., 1991). La disminución de las concentraciones de GSH en el tejido se observa después de la isquemia y de la excitotoxicidad (Orwar et al., 1994; Shivakumar et al., 1995; Florean et al., 1997). Entre los posibles mecanismos tóxicos asociados con el glutatión, se incluye un incremento en el rompimiento de GSH y la inhibición de su síntesis o el flujo de GSH de su forma oxidada GSSG. Necesariamente, el flujo de glutatión ocurre en el cerebro de la rata sometida isquemia (Andiné et al., 1991; Orwar et al., 1994; Yang et al., 1994), y un flujo masivo de GSH en las células no neuronales no apoptóticas se ha sugerido como un paso hacia la muerte celular (van den Dobbelen et al., 1996; Macho et al., 1997;

Ghibelli et al., 1998). Se ha establecido que la mitocondria no posee las enzimas necesarias para la síntesis de GSH, por lo cual el GSH mitocondrial es originado en el citosol (Griffith y Meister, 1995). Algunos estudios sobre las mitocondrias del hígado de rata indican que la homeostasis del glutati6n mitocondrial es regulada por un sistema de transporte multicomponente, el cual quizá explique la notable capacidad de la mitocondria para incorporar y retener el GSH (Martansson et al, 1990). El GSH se encuentra en concentraciones de 1-2 mM en el cerebro, localizándose casi exclusivamente en las células gliales, aunque también se observa en las terminales nerviosas de las neuronas y los axones (Raps et al., 1989). La liberaci6n del GSH es principalmente neural; sin embargo, existe la posibilidad de que las neuronas sean capaces de liberar alguna sustancia que a su vez ayude a la liberaci6n de GSH a partir de las células gliales (Ghibelli et al, 1998).

Se ha tomado a la disminuci6n de GSH como un índice de daño por radicales libres (Smith, 1991). La tasa de GSH/GSSG juega un papel importante en la defensa contra el daño por radicales libres y las concentraciones de GSH representan un mejor marcador oxidativo ya que estos pueden ser afectados por más de una vía; siendo que el GSH está involucrado en diferentes sistemas de defensa antioxidante, el cambio en los niveles de GSH puede, en la mayoría de los casos, ser considerado como un marcador inespecífico del daño por radicales libres (Hageman, 1992).

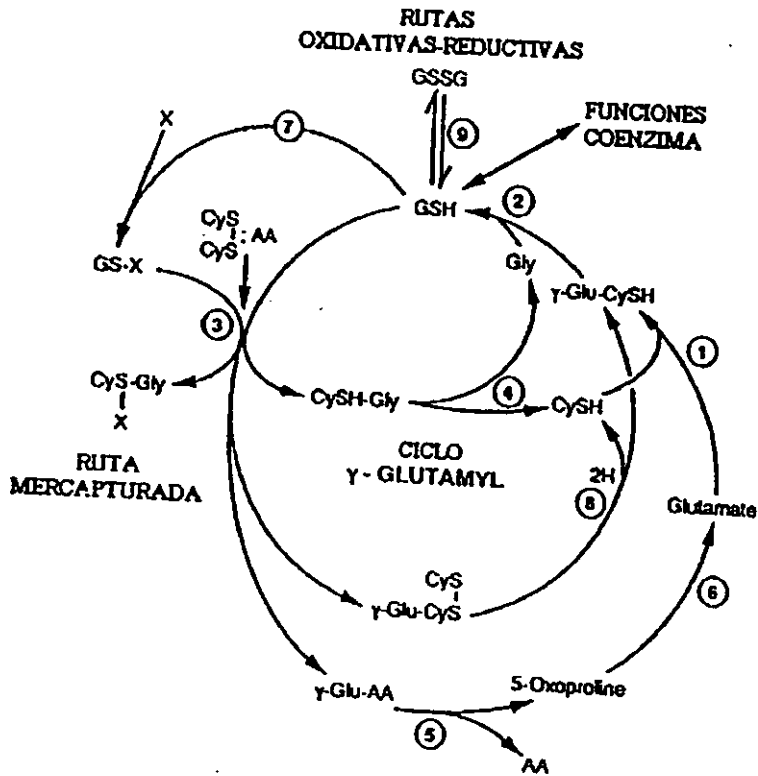
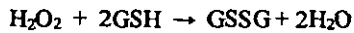


Figura 7. Rutas metabólicas del glutatión (Meister, 1994).

2.3.3. GLUTATIÓN PEROXIDASA

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) está localizada en el citosol y en los compartimentos mitocondriales celulares (Panfili et al., 1991). Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Mediante esta reacción, la GPx se constituye como un sistema de defensa antioxidante importante, al inactivar al H_2O_2 y otros peróxidos

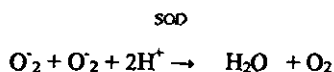
La GPx es una enzima tetramérica soluble con una masa molecular de 95 kDa. Cada subunidad está constituida por un átomo de selenio en su estado reducido, incorporando dentro de un residuo de selenocisteína al sitio activo de la enzima. La presencia de selenio es necesaria para la actividad enzimática. La actividad catalítica de la selenocisteína podría ser introducida dentro de la estructura de la proteína GPx por una incorporación co-transduccional directa o por una adición post-traducciona del selenio de un aminoácido común (Baker et al., 1993).

La concentración más alta de la GPx se encuentra en el hígado. En los cerebros humanos la distribución de la GPx es primordialmente en neuronas y astrocitos. Se ha encontrado GPx en el cerebro de humano después de un infarto (Lindenau, 1998).

2.3.4. SUPERÓXIDO DISMUTASA

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una metaloproteína que cataliza la conversión de los aniones superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Las SODs se han clasificado en tres grupos, de acuerdo al ión metálico unido a su sitio activo: dependientes de Cu/Zn, Fe, o Mn.

La superóxido dismutasa cataliza la dismutación de O_2^- de la siguiente manera:



En células de mamíferos, el citoplasma contiene primordialmente a la SOD dependiente de Cu/Zn (Cu/ZN-SOD) (Fridovich, 1989) mientras que en matriz mitocondrial se localiza a la SOD dependiente de Mn (Mn-SOD) (Weisiger y Fridovich, 1973; Matsuda et al, 1990; Del Maestro y McDonald, 1989; Marklund, 1978; McCord et al, 1977).

La Mn-SOD es un homotetrámero con un peso molecular de alrededor de 88 kDa por tetrámero y está compuesta por 4 subunidades unidas no covalentemente que contienen un átomo de Mn/monómero en su sitio activo (Markund, 1978; McCord et al , 1977). La MnSOD puede ser inducida por citocinas: el factor de necrosis tumoral (TNF), las interleucinas (IL)-1 y los lipopolisacáridos (LPS) (Kawaguchi et al., 1990; Masuda et al., 1988; Visner et al., 1991; Wong et al., 1989). Esta enzima tiene efecto protector antioxidante porque mantiene estados bajos de concentración del radical superóxido generalmente en el intervalo nM (Weisrger y Fridovich, 1973). Esta enzima también protege directa e indirectamente contra los efectos del radical

superóxido, previniendo la formación del peroxinitrito un derivado tóxico del óxido nítrico por competencia con el ON por el superóxido (Crow y Breckman, 1995; Fridovich, 1975, 1995). Tanto la Mn-SOD localizada en mitocondria y ocasionalmente en citosol, como la Cu/Zn-SOD son inducibles en una gran variedad de tejidos y tipos celulares bajo condiciones de elevada cantidad de radicales libres generados por radiación, inflamación o condiciones de hipoxia (Akashi et al 1995; Harris et al 1991; Kato et al 1995; Watanabe et al 1996; Wong, 1995).

Se ha reportado que la Mn-SOD está confinada a las células de la astrogliya y de las neuronas y la Cu/Zn-SOD está en la microglia, la astrogliya y las neuronas bajo condiciones basales y nocivas (Furata et al 1995; Liu et al., 1993; Pardo et al., 1995).

III. OBJETIVOS

GENERAL.

Evaluar la actividad enzimática de Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y Gpx en el cuerpo estriado de roedores así como la lipoperoxidación y cambios en GSH como marcadores de estrés oxidante generados por la inyección intraestriatal de QUIN y 3-NP como modelos farmacológicos de la EH y en un modelo transgénico de la EH.

PARTICULARES

- Cuantificar los productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación (PLF) en el cuerpo estriado de ratas lesionadas con 3-NP o con QUIN a las 3 y 6 horas después de su administración.
- Analizar los cambios de GSH (Glutación reducido) en el cuerpo estriado de ratas lesionadas con 3-NP, QUIN, 3 ó 6 horas después de su administración.
- Evaluar la actividad de dos enzimas antioxidantes: (Glutación peroxidasa y Superóxido dismutasa) en el cuerpo estriado de ratas lesionadas con 3-NP o QUIN 2, 3 ó 6 horas después de su administración,
- Evaluar la actividad de la superóxido dismutasa en estriados de ratones transgénicos a las 19 y 35 semanas de edad.
- Evaluar con microscopía electrónica, el daño mitocondrial en el cuerpo estriado de ratas lesionadas con 3-NP o QUIN 3 y 6 horas después de la administración de las toxinas, y también para el caso de los ratones transgénicos a las 19 y 35 semanas de edad.

IV. HIPÓTESIS

- Si conocemos la toxicidad que tanto el 3-NP como el QUIN ejercen sobre el SNC entonces esperamos que el patrón del daño neural generado por estas dos toxinas involucre alteraciones específicas en sistemas antioxidantes endógenos y que dichos cambios se expresen de manera selectiva.
- Esperamos encontrar evidencias de alteraciones en la actividad enzimática de la Mn-SOD y Cu/Zn-SOD en ratones transgénicos para la EH.
- Si conocemos el mecanismo de acción de las toxinas y los mecanismos ejercidos por el transgen, entonces esperamos encontrar daño a nivel mitocondrial que ponga en evidencia alteraciones energéticas primarias en estos tres modelos de la EH.

por cada 60 minutos, después la disminución en GSH de la reacción no enzimática fue restada.

ANÁLISIS DEL CONTENIDO ESTRIATAL DE GSH

Se empleo la técnica de Hissin y Hilf (1976). Una vez realizada la inyección estereotáxica del QUIN o del 3-NP y transcurrido un tiempo de 2, 3 y 6 horas, se obtuvo el tejido estriatal de las ratas y se homogenizaron en un volumen de 3.75 ml de amortiguador fosfatos 50mM pH 7.8.0 con EDTA 0.005 M + 1.0 ml de HPO_3 al 25%, se tomaron 0.5 ml para la determinación de proteínas; el volumen restante se centrifugó a 15,000 rpm durante un período de 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 0.5 ml para determinar la concentración de GSH, como se describe a continuación: se tomaron 0.5 ml + 4.5 ml de amortiguador de fosfatos pH 8.0 y posteriormente se agitaron con vortex. Se obtuvo una alícuota de 100 μl de la mezcla anterior y se mezcló nuevamente con 1.8 ml de buffer de fosfatos pH 8.0 + 100 μl de la mezcla OPT-metanol (1:1, v/v). Se adicionaron 200 μl de N-etilmaleimida (0.4 M) para inhibir la oxidación de GSH a GSSG. Se incubaron las alícuotas a temperatura ambiente por 15 minutos y protegidos de la luz, por último se determinó la señal de fluorescencia a 420nm de emisión y 350 nm de excitación, en un Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin- Elmer modelo. LS 50B. Finalmente se construyeron curvas de calibración para GSH de la siguiente manera: de una solución Stock conteniendo 1 mg de GSH/ml de amortiguador, se tomaron 200 μl y se aforaron a 10 ml con amortiguador de fosfatos pH 8.0 (conteniendo EDTA 0.005 M). De esta última solución se tomaron 250 μl , 500 μl , 1000 μl y 1500 μl y se aforaron cada uno a 10 ml con amortiguador de fosfatos + EDTA 0.005 M. De cada uno de estos puntos se tomaron entonces 100 μl y se adicionaron con 1880 μl de amortiguador de fosfatos + EDTA 0.005 M + 100 μl de la mezcla de OPT-metanol (1:1 v/v), dejándose reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y protegidos de la luz. Para obtener el punto blanco se adicionaron 1900 μl de amortiguador + 100 μl de la mezcla OPT- metanol (1:1, v/v) únicamente. Posteriormente, se determinó la señal de

luminiscencia bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La expresión de resultados es en nmol/mg de proteína.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA SOD

Se determinó por la técnica basada en la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) (Oberley & Spitz, 1984). Se utilizó una mezcla de reacción que contenía 40 ml de xantina 0.3 mM + 20 ml de EDTA 0.6 mM + 20 ml de NBT 10 μ M + 6 ml de albúmina sérica bovina 0.1% + 12 ml de carbonato de sodio 400 mM. Se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración final de 167 U/L. En los tubos de ensayo se colocaron 2.45 ml de la mezcla de reacción y se mantuvieron a una temperatura de 25°C, se adicionaron 0.5 ml del homogenado diluido 1:100 e inmediatamente se agregaron 50 μ l de la solución de xantina oxidasa con intervalos de 30 segundos durante 30 minutos por tubo. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero sin la solución de xantina oxidasa, se incubaron 30 minutos y al término de esta incubación se adicionó 1 ml de una solución de cloruro cúprico 0.8 mM. Se determinó la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro BEKMAN DU-64. De forma simultánea, se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa sin homogenizado. Una unidad de SOD se define como aquella cantidad que inhibe en un 50% la reducción de NBT. Para determinar la actividad de Mn-SOD, el homogenizado se incubó durante 30 minutos con una solución de DDC 50 mM con la finalidad de inhibir a la CuZn-SOD; la actividad de esta última se obtuvo restando la actividad de Mn-SOD de la actividad de SOD total. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE Mn-SOD

El homogenizado se inactivó con DDC 50 mM incubado durante 1 hora a 30°C (100 μ l de homogenizado + 100 μ l de DDC 100 mM). Posteriormente el homogenizado inactivado con DDC se dializa (con una membrana de diálisis que retiene proteínas de más de un peso de 12000 o más) realizando dos cambios de 400 volúmenes en una solución amortiguadora de fosfatos

5mM (pH 7.8) EDTA 0.1 mM en un tiempo de tres horas. Para determinar la actividad se sigue el mismo procedimiento que para la SOD total

DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Se sacrificaron a los animales, se extrajeron los estriados lesionados (Glowinski J et al., 1996) y se homogenizaron en 3 ml de solución salina (NaCl 0.9%). Todo este proceso se realizó en hielo. Se transfirió el homogenado a tubos de vidrio y se tomó una alícuota de 1 ml del homogenado para determinar la proteína. Del resto del homogenado se tomó 1 ml al cual se le agregaron 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol 2:1. Los tubos se agitaron por 10 segundos, se metieron en hielo cubiertos de la luz, por 45 minutos. Se extrajo la parte superior (fase metanólica acuosa) con bomba de vacío y el restante se utilizó para medir la fluorescencia (fase clorofórmica). Se tomaron 950 μ l de esta última fase en una celda de fluorescencia y se agregaron 50 μ l de metanol, se agitaron para leerse en un espectrofotómetro de fluorescencia, modelo L550B de Perkin-Elmer a 750 nm de excitación y 430 nm de emisión. Los resultados obtenidos fueron corregidos por gramo de tejido y se expresaron en unidades de fluorescencia por gramo de tejido.

La sensibilidad del espectrofotómetro se ajusta a 300 unidades de fluorescencia con una solución estandar de quinina de 0.1 mg/ml en una solución acuosa de ácido sulfúrico 0.05 M.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se realizó la perfusión de los animales, se extraen los tejidos estriatales, se cortan en pequeños segmentos y se fijan en glutaraldehído al 25% en un amortiguador cacodilatos pH 7.0. 1 M por 1 hora y media. Se lava con amortiguador de cacodilatos por 10 minutos con postfijación de OsO_4 al 0.5% en amortiguador de cacodilatos. Se lavó nuevamente con amortiguador de cacodilato y se procedió a deshidratar el tejido con alcoholes graduales de 70°, 80°, 90°, 100° (diez minutos cada uno), y óxido de propileno con dos cambios de 15 minutos. Se preincluyó con EPON-Oxido de propileno 1:1 durante una noche y se incluyó en EPON (resina) puro. Se hizo la polimerización a 60° C (Polímero de EPON). Posteriormente se realizaron cortes de una micra y se tificaron con azul de toluidina (para cortes finos).

Se realizaron cortes finos de 60-70 nm, y se contrastaron (teñir) con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo (contraste de rutina); se observa al microscopio electrónico y se obtienen las micrografías, de las cuales se tomaron en cuenta solo las mitocondrias que se encontraron alrededor del núcleo celular para comparar los distintos tratamientos y ratones transgénicos.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

Todas las muestras se analizaron de acuerdo con el método de Lowry y col. (1951) para determinar su contenido de proteínas. Se diluyó cada muestra en proporción 1:20 (50 μ l del homogenado + 950 μ l de agua), se pipetearon 0.4 ml de la muestra diluida y agregaron 2 ml de la siguiente solución: 49 ml de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N + 0.5 ml de tartrato de Na/K al 2 % + 0.5 ml de CuSO_4 al 1 %. 10 minutos después, se agregó el reactivo folín-fenol 1:1 (0.2 ml por cada muestra) y se leyó la absorbancia después de 30 minutos en un espectrofotómetro U. V visible a 550 nm, Lamda 20 Perkin- Elmer.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas paramétricas, por lo que los tratamientos con sólo dos grupos se compararon con la prueba de t de student para medias independientes. Para los tratamientos con tres grupos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

V. MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar para los experimentos de modelos farmacológicos de la EH, con un peso de 250 a 300g. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez.

También se emplearon ratones transgénicos hembras de la línea R6/1 de 19 y 35 semanas de edad. Los animales fueron proporcionados por el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del Centro de Investigación y de estudios Avanzados de IPN, CINVESTAV.

REACTIVOS

Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada (desionizador Milli R/Q de Millipore). El QUIN y el 3-NP, así como otros reactivos, fueron todos obtenidos de conocidas marcas comerciales (SIGMA, Merck, Aldrich, etc).

Se preparó una solución de QUIN (240 nmol/ μ l) disuelto en solución salina (0.9% NaCl) y llevado a pH de 7.4 con una solución de NaOH 0.1 N. El 3-NP (550nmol/ μ l) se disolvió también en solución salina 0.9% y se ajustó a un pH de 7.4 con una solución de carbonato de sodio 0.1 M. Esta misma solución de NaCl 0.9% sirvió como control para la microinyección.

MICROINYECCIÓN ESTEREOTÁXICA

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) antes de la administración intraestriatal. Se realizaron inyecciones unilaterales de 1 μ l de QUIN o 3-NP con una microjeringa Hamilton de 10 μ l de capacidad en el estriado derecho de cada rata en las siguientes coordenadas estereotáxicas + 0.5 mm anterior a bregma, - 2.6 mm lateral a bregma y - 4.5 ventral a la dura correspondiente a caudo putamen, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998). Las toxinas fueron inyectadas lentamente, durante un periodo de 2

minutos. Los animales del grupo control fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina. Después de la administración de QUIN y 3-NP, se obtuvieron los estriados lesionados a las 2,3 ó 6 horas y se homogenizaron en una solución de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.4 hasta su procesamiento para la determinación de la actividad enzimática de GPx, SOD o el contenido de GSH. Para los ratones transgénicos se obtuvieron los estriados lesionados a la 19 y 35 semanas de edad y se realizó el mismo procesamiento. Para evaluar la peroxidación de lípidos se obtuvieron los estriados lesionados y se homogenizaron en solución salina. Para evaluar la observación con microscopia electrónica, se realizó la disección tanto de los cuerpos estriados lesionados con los fármacos, como los de los cuerpos estriados de los ratones transgénicos (Głowinski J et al., 1996), y se procedió a realizar la técnica para microscopia electrónica.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA GPx

Para la determinación de la actividad enzimática de la GPx se empleó la técnica de Mills (1957). Treinta μl de los homogenados de estriado se incubaron en el siguiente medio: 0.5 ml de GSH 2.0 mM + 0.5 ml de amortiguador de fosfatos de sodio 0.40M (pH 7.0 con 4×10^{-4} M de ácido etildiamino tetracético (EDTA)) + 0.25 ml de de NaN_2 0.1M en agua para obtener un volumen final de 2.0 ml. Después de 5 minutos en agitación a 37°C , se adicionó 1.0 ml de H_2O_2 1.25 mM (preincubado a 37°C) fue adicionado. Después de 3 minutos, se tomo una alícuota de 1.0 ml de la mezcla de incubación fue removida y se adicionó a 4.0 ml de una solución de ácido metafosfórico (1.67 g de ácido metafosfórico glacial + 0.2 g de EDTA + 30 g de NaCl). Posteriormente, se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos; el GSH libre de proteínas se determinó usando una mezcla que contenía 1.0 ml del centrifugado en 1.0 ml de buffer fosfatos 0.4 M + 0.5 ml de ácido 5,5-di-tiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Se determinó la absorbancia a 412 nm después de adicionar el último reactivo, en un espectrofotómetro U.V visible Perkin- Elmer, modelo. Lambda 20. La muestra blanco (con H_2O_2) se corrió simultáneamente con las muestras tratadas. Para obtener la actividad de GPx se construyó una curva de calibración de la siguiente manera: se determinaron cuatro puntos de calibración que contenían: a) 2.0 ml de amortiguador fosfatos + EDTA pH 7.0+0.5 ml de DTNB; b) 1.497 ml de amortiguador de fosfatos + EDTA 1M + 25 μl de GSH + 0.5 ml de DTNB; c) 1.475 ml de amortiguador de fosfatos + EDTA 1M + 25 μl de GSH + 0.5 ml de DTNB y d) 1.25 ml de amortiguador de fosfatos + EDTA 1M + 250 μl GSH + 0.5 ml de DTNB. Todos los cuatro puntos contenían un volumen final de 2.5 ml. Por último, se registró la absorbancia a 412 nm, dos minutos después de adicionar el último reactivo, en un espectrofotómetro U.V visible Perkin- Elmer, modelo. Lamda 20. Una unidad de Gpx se define como el 50% de la disminución de GSH

VI. RESULTADOS

6.1. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN o 3-NP sobre la peroxidación de lípidos en ratas.

En la figura 8 podemos observar a las 3 horas después de la inyección un aumento del 73% de lipoperoxidación en nuestros tratamientos con QUIN vs el control. El 3-NP indicó un aumento del 193% de lipoperoxidación vs control.

A las 6 horas el QUIN no presentó cambios con respecto al control, pero si hay un aumento para el 3-NP del 208% vs control.

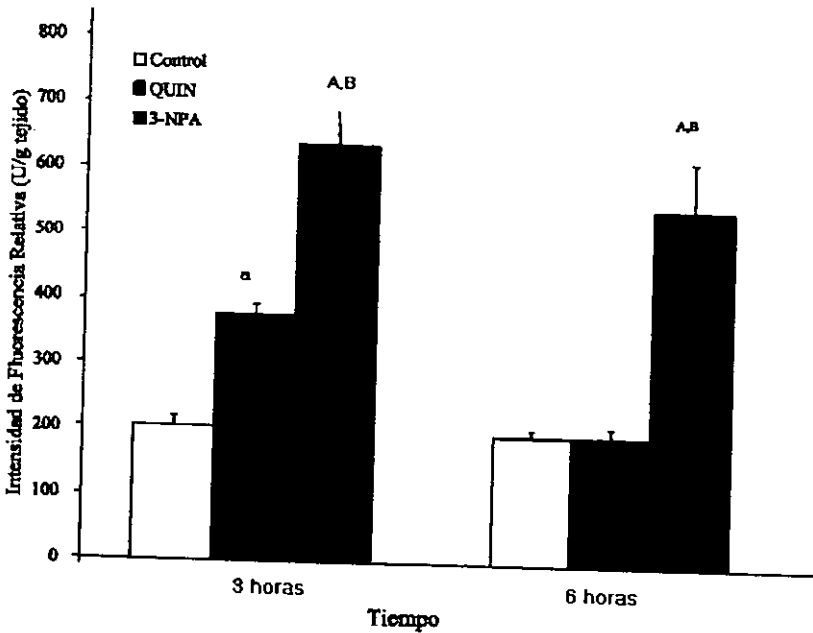


Figura 8. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN (240/nmol/ μ l) y 3-NP (500 nmol/ μ l) sobre los niveles de peroxidación de lípidos. Cada valor es la media \pm E.E. ^a $p < 0.05$ diferencias vs control; ^{A,B} $p < 0.01$, diferencias contra QUIN; ANOVA seguido de una prueba de Tukey. $n = 6$ experimentos independientes

6.2. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN y 3-NP sobre el nivel de GSH.

En la figura 9 se muestra a las tres horas después de la administración del QUIN una disminución marcada de GSH del 64% vs el control, en tanto que el 3-NP también genera una disminución significativa del 18% vs el control. A las seis horas se puede observar para el caso del QUIN una disminución menos marcada del 29% pero aun estadísticamente significativa contra el control, y se observa una disminución en el nivel de GSH del 47 vs el control por efecto del 3-NP.

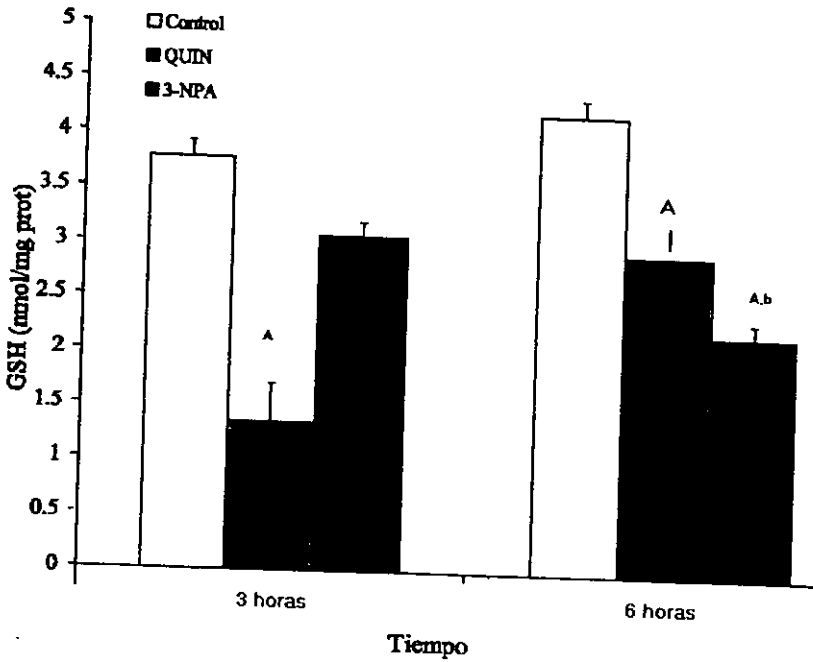


Figura 9. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN (240nmol/ μ l) y 3-NP (500nmol/ μ l) el contenido estriatal de GSH. Cada valor es la media \pm E.E. ^a $p < 0.01$ diferencias vs control; ^a $p < 0.05$ diferencias vs control; ^b $p < 0.05$ diferencias vs QUIN. ANOVA seguida por una prueba de Tukey. $n=6$ experimentos independientes.

6.3. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN o 3-NP sobre la actividad enzimática estriatal de la GPx.

En la figura 10 se observa que a las tres horas, la actividad enzimática de la glutación peroxidasa no presenta cambios estadísticamente significativos por el tratamiento con QUIN, mientras que para el 3-NP se observa un aumento significativo contra el control del 37%. A las 6 horas después de los tratamientos, no se encontraron cambios estadísticamente significativos ni para el QUIN ni para el 3-NP vs control.

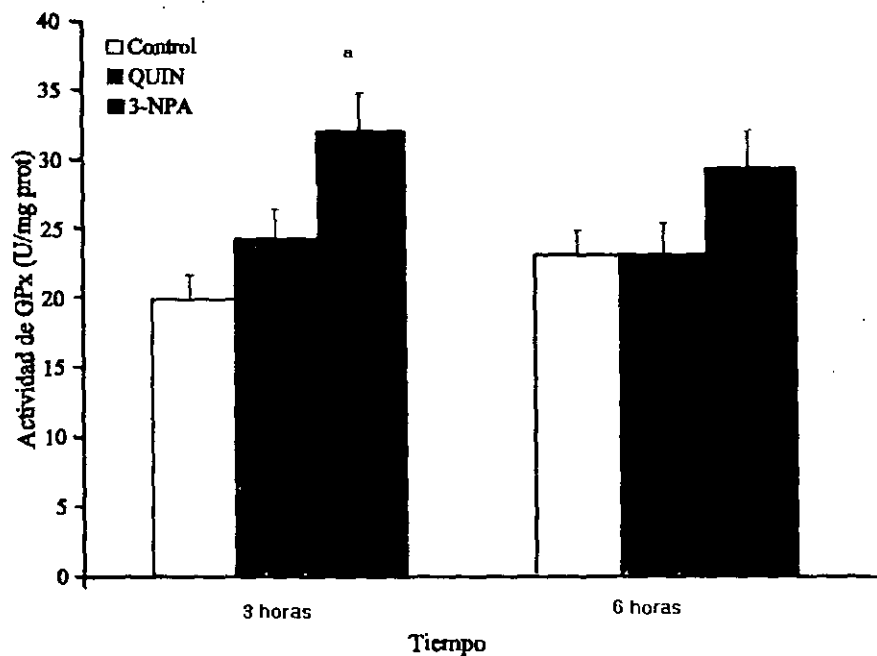


Figura 10. Administración intraestriatal de QUIN (240nmol/ μ) y 3-NP (500nmol/ μ) sobre la actividad de GPx. Cada valor es la media de \pm E.E. ^ap<0.05 diferencias vs control. ANOVA seguido de prueba de Tukey. n= 6.

6.4. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN sobre la actividad enzimática de Mn-SOD y Cu/Zn-SOD, a las dos horas después de su inyección.

En la figura 11 se puede observar que la actividad de Mn-SOD no presenta cambios vs control, a diferencia de Cu/Zn-SOD que presenta una disminución significativa del 39% vs control.

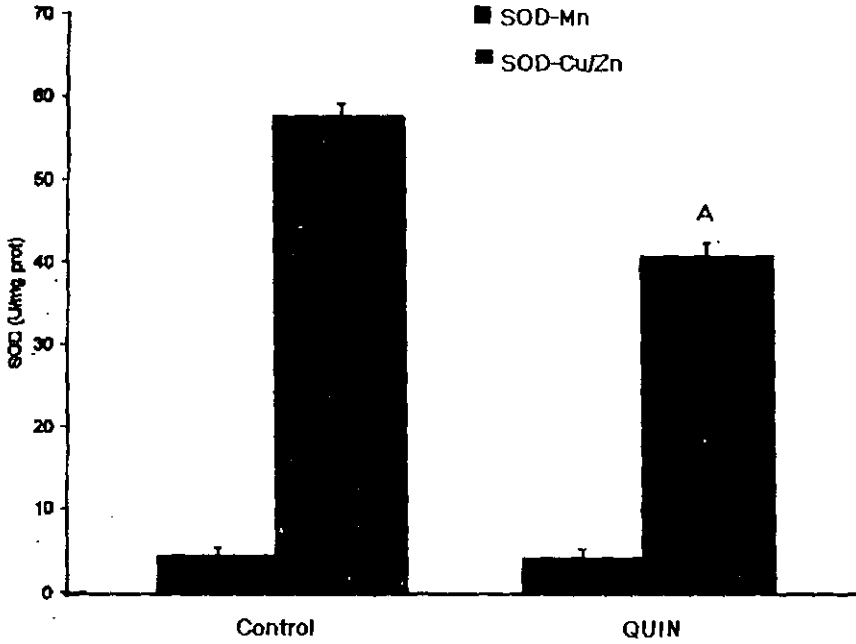


Figura 11. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN (240nmol/ μ l) sobre la actividad estriatal de SOD-MN y SOD-CuZn. Cada valor es la media de \pm E.E. ^Ap<0.01 diferencias vs control. Prueba "t" de Student. n= 8.

6.5. Efecto de la administración del 3-NP sobre la actividad enzimática de la Mn-SOD a tres y seis horas después de la lesión.

En la figura 12 podemos observar que a las tres horas hay una disminución de la actividad de Mn-SOD del 29% vs control conservándose la misma tendencia a las seis horas con una disminución significativa del 64% vs control.

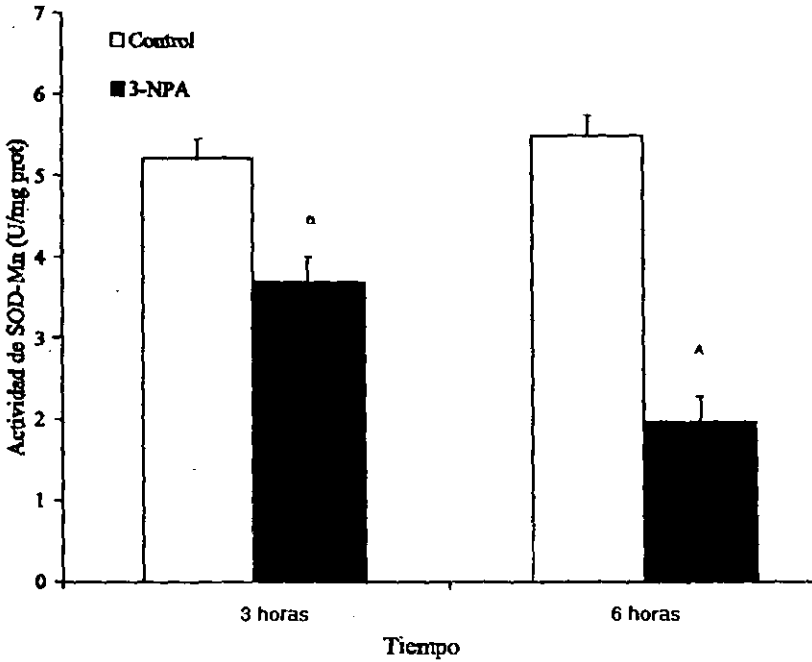


Figura 12. Efecto de la administración intraestriatal de 3-NP (500nmol/ μ l) sobre la actividad estriatal de SOD-Mn. Cada valor es la media \pm E.E. $\wedge p < 0.01$ diferencias vs control; $^* p < 0.05$ diferencias vs control. Prueba "t" de Student. n= 7-9 experimentos independientes.

6.6. Efecto de la administración intraestriatal de 3-NP sobre la actividad enzimática de Cu/Zn-SOD a tres y seis horas después de su inyección.

En la figura 13 se muestra que a las tres horas después de la administración de la toxina se encuentra una disminución significativa del 22% vs control, observándose la misma tendencia a las seis horas, con una disminución también significativa del 19% vs control.

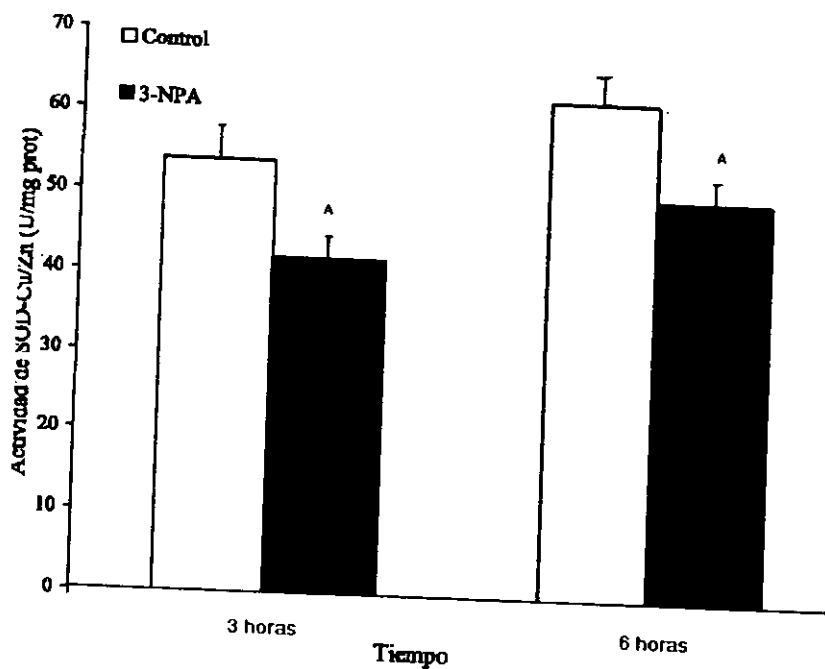


Figura 13. Efecto de la administración intraestriatal de 3-NP (500nmol/ μ l) sobre la actividad estriatal de SOD-CuZn. Cada valor es la media \pm E.E. ^Ap < 0.01 diferencias vs control. Prueba "t" de Student. n=7-9 experimentos independientes.

6.7. Actividad enzimática de Mn-SOD en estriado de ratones transgénicos para la mutación de la EH

La figura 14 muestra que a las 19 semanas de edad de los ratones transgénicos no hay cambios significativos en la actividad de la Mn-SOD vs control; para los ratones transgénicos a las 35 semanas de edad, se observa un aumento del 17% pero no significativo vs control.

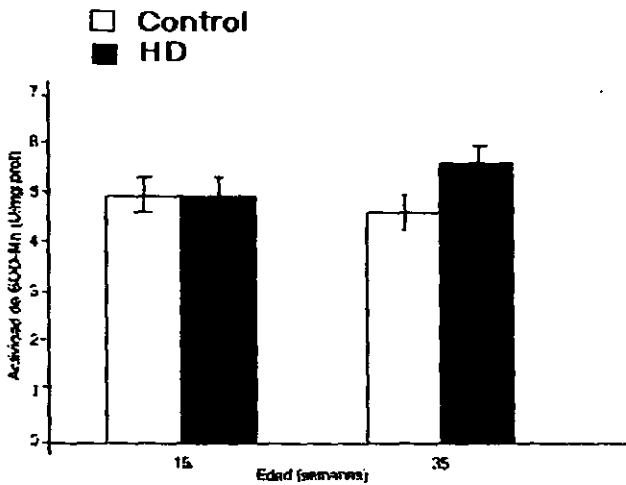


Figura 14. Cambios en la actividad de SOD-Mn en ratones transgénicos para EH a las 19 y 35 semanas de edad. "t" de Student. n=3 experimentos independientes.

6.8. Actividad de Cu/Zn-SOD en estriado de ratones transgénicos para la mutación de la EH.

En la figura 15 podemos observar un aumento significativo del 25% vs control en los ratones transgénicos a las 19 semanas de edad, siendo el caso contrario para los transgénicos para EH, a las 35 semanas de edad donde se observa una disminución significativa del 17% vs control.

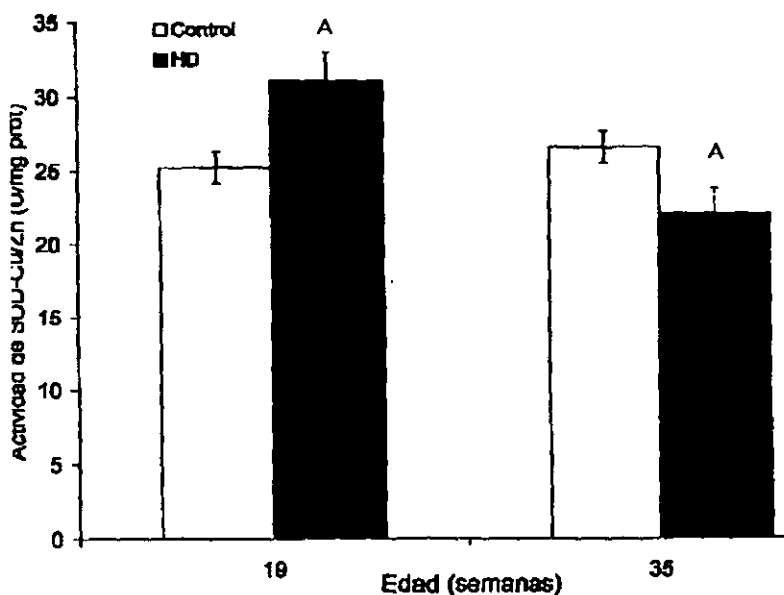


Figura 15. Cambios en la actividad de SOD-CuZn en ratones transgénicos para EH a la 19 y 35 semanas de edad. Cada valor es la media \pm E.E. ^Ap < 0.01 diferencias vs control. "t" de Student. n=3 experimentos independientes.

6.9. Descripción de las observaciones por microscopía electrónica

Los cortes teñidos con azul de toluidina muestran en los animales del grupo control fibras con mielina bien conservada, el neuropilo con aspecto normal y los cuerpos neuronales bien preservados (Figura. 16 A, D). El grupo tratado con QUIN muestra bien conservado el neuropilo, los cuerpos neuronales y los haces de fibras similares a los del grupo control (Figura. 16 B). En el grupo tratado con 3-NP se observó edema intersticial con los cuerpos neuronales retraídos (Figura 16 C). Los ratones transgénicos muestran a las 19 y 35 semanas de edad una apariencia normal con cuerpos neuronales normales y haces de fibras con mielina de apariencia normal (Figura. 16 E, F).

Los resultados obtenidos en el estudio con microscopía electrónica muestran a las mitocondrias con crestas y su doble membrana bien definidas, el núcleo, los ribosomas y lisosomas bien identificadas con aspecto normal en el grupo control (Figuras. 17 A, D y 18 A, D). En las ratas tratadas farmacológicamente, las observaciones muestran a las mitocondrias con aspecto normal pero con ligero edema intercelular (Figuras. 17 B, 18 B) en el grupo tratado con QUIN; mientras que en el grupo tratado con 3-NP la estructura de la mitocondria está alterada, ya que se observan hinchadas y con destrucción de las crestas mitocondriales (Figuras. 17 C, 18 C). Para los ratones transgénicos se manejaron 2 edades, en donde se pudo observar que a las 19 semanas hay una ligera pérdida de las crestas mitocondriales, asimismo el espacio intracelular se observó con aspecto normal (Figuras. 17 E y 18 E). A las 35 semanas de edad, los ratones transgénicos mostraron cambios muy marcados en la estructura de las mitocondrias, con una pérdida de las crestas mitocondriales, con edema intramitocondrial, así como también edema intracelular (Figuras. 17F y 18 F).

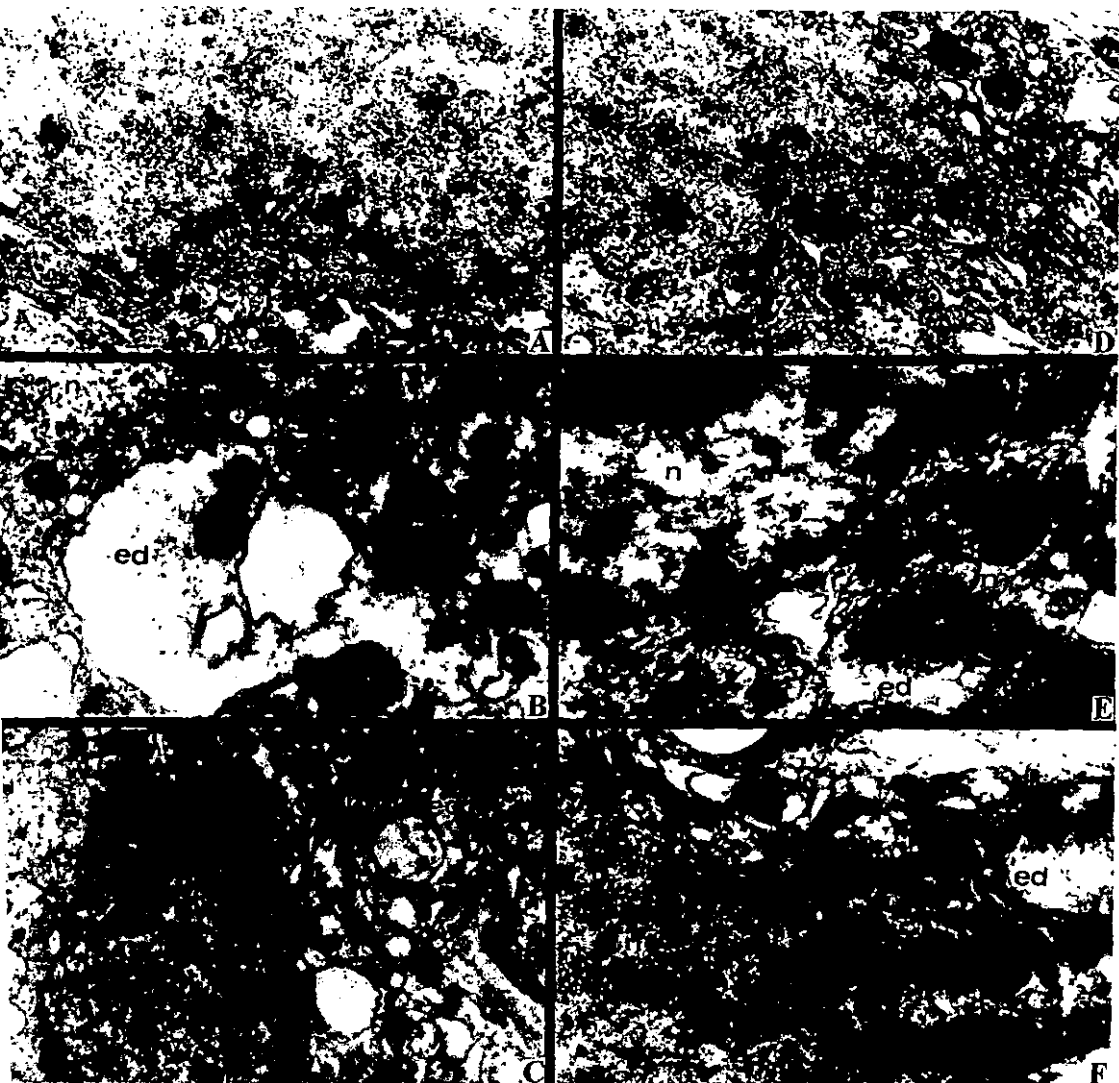


Figura 17.- Micrografía electrónica de cuerpo estriado de rata con: A) Control, B) QUIN, C) 3-NP, D) Control transgénico de 35 semanas de edad, E) transgénico de 19 semanas de edad y F) Transgénicos de 35 semanas de edad. A, D) Mitocondrias (m) con crestas y núcleo (n) con aspecto normal. B) Mitocondrias con apariencia normal (m) y edema intracelular (ed). C) Mitocondrias hinchadas (mh) con pérdida de crestas (↑), núcleo (n) con aspecto normal y edema intracelular (ed). E) Mitocondrias con pérdida de crestas (↑) y núcleo (n) conservado, hay edema intracelular (ed). F) Mitocondrias (m) con destrucción de crestas (↑), edema intracelular y núcleo (n) conservado. X 13,200.

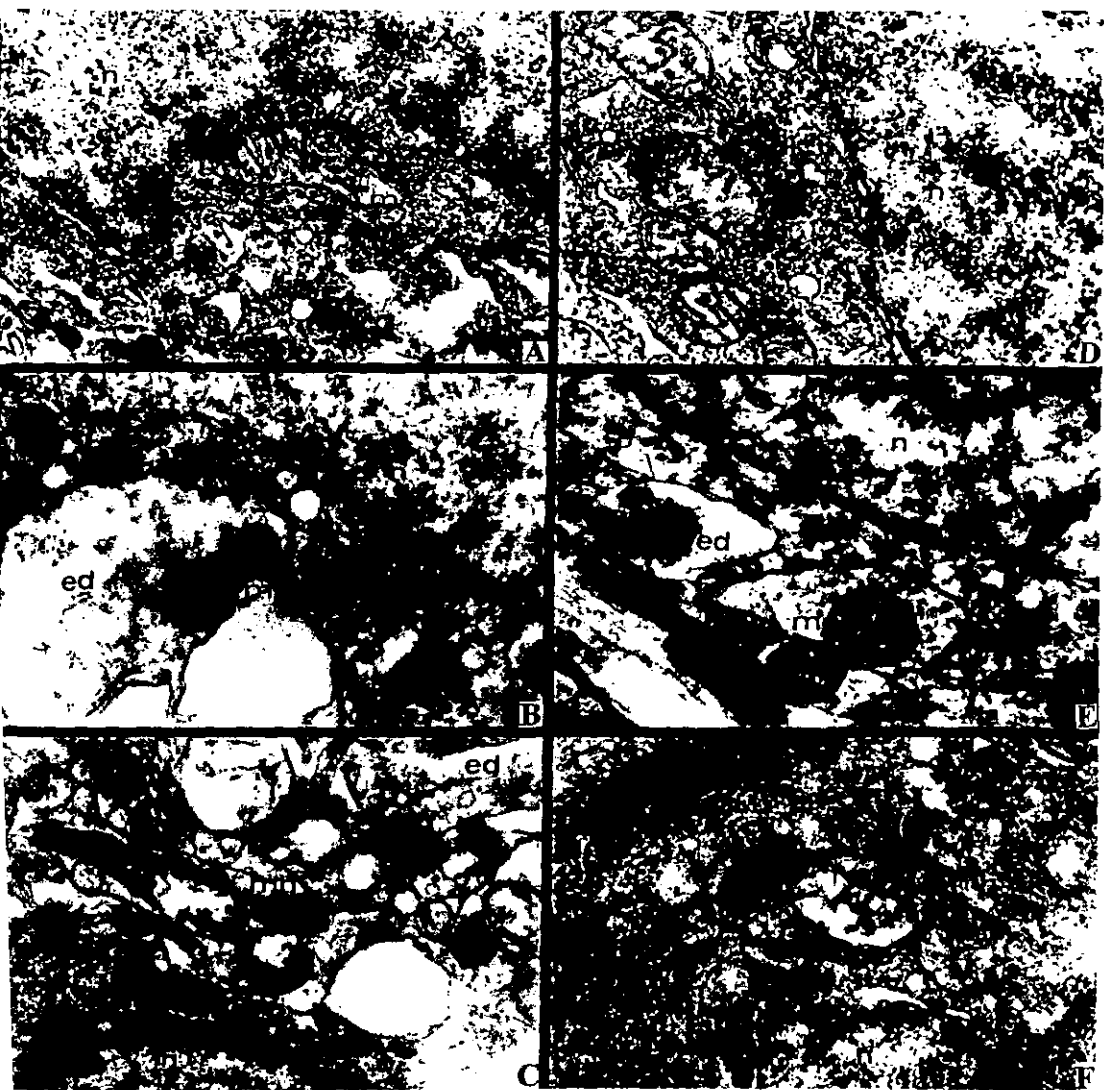


Figura 18.- Micrografía electrónica a mayor aumento de cuerpo estriado de rata: A) Control, B) QUIN, C) 3-NP, D) Control transgénico de 35 semanas de edad, E) Transgénicos de 19 semanas de edad y F) Transgénicos de 35 semanas de edad. A, D) Mitochondrias (m) y núcleo (n) con aspecto normal. B) Mitochondrias (m) y núcleo (n) con apariencia normal, ligero edema intracelular (ed). C) Numerosas mitochondrias hinchadas (mh), y edema intracelular (ed). E) Mitochondrias (m), núcleo conservado (n) y ligero edema (ed) intracelular. F) Numerosas mitochondrias hinchadas (mh) con pérdida de crestas. X 33,200.

VII. DISCUSIÓN

La lipoperoxidación es uno de los procesos indicativos de estrés oxidativo, y es particularmente activa en el cerebro, y en general en membranas ricas en ácidos grasos poli-insaturados. La lipoperoxidación (LP) induce cambios en la fluidez membranal y en el potencial de membrana, en la función de los receptores y en la permeabilidad iónica (Schroeder., 1984; Joseph y col., 1992). En este trabajo se observó un incremento significativo de la LP tres horas después de la administración del QUIN, sin embargo no se encontraron cambios a las 6 horas; en el caso del 3-NP se encontró un aumento de la LP en ambos tiempos. Existen reportes sobre el papel del QUIN y del 3-NP como inductores de radicales libres, que llevan a su vez a una neurotoxicidad y peroxidación de lípidos (Ríos y Santamaría. 1991; Santamaría y col., 1999; Stípek y col., 1997; Michel y col., 2000). Este patrón involucra un incremento del calcio citosólico y una toxicidad asociada al óxido nítrico (Pérez-Severiano y col., 1998). Por otro lado, Alam y col. (2000), reportaron que no hay evidencia de peroxidación de lípidos en cerebros postmortem de pacientes con EH. Sin embargo, Broene y col. (1999), sugiere que un incremento en la acumulación de lipofuscina en neuronas estriatales es evidencia de una elevada peroxidación de lípidos cerebral en dichos pacientes. Algunos autores han reportado que existe evidencia real de la participación de los mecanismos de producción de radicales libres generados por el daño mitocondrial y la excitotoxicidad en la EH (Fiskum et al., 1999; Tabrizi et al., 2000). Consideramos que probablemente en algún momento del desarrollo de la enfermedad podría estar aumentando la lipoperoxidación como lo muestran nuestros modelos involucrando un daño oxidativo en la enfermedad. La LP generada en particular por el QUIN en modelos de EH podría darse por la activación de receptores a glutamato que a su vez permite el flujo de calcio hacia el interior celular, provocando eventos como la generación de especies reactivas del oxígeno mediante la

activación de rutas metabólicas dependientes de calcio (Choi., 1987; Hartley et al., 1993; Velázquez et al., 1997; Atlante et al., 1999).

Se sabe que el daño excitotóxico en el cerebro afecta el equilibrio entre agentes antioxidantes que se traduce en cambios en el metabolismo del GSH. Nuestros resultados muestran que tanto el 3-NP como el QUIN a 3 y 6 horas producen una disminución significativa del GSH, que es un efecto que producen concentraciones altas de otros agonistas glutamatérgicos (Olanow., 1993; Murphy et al., 1990; Babu y Bawari, 1997; Pereira y Oliveira, 1997). Se ha demostrado que el GSH puede interactuar con el sitio redox modulador de los receptores del tipo NMDA y así inhibir su actividad, disminuyendo la permeabilidad de calcio (Leslie y col., 1999). Existen trabajos que explican una parte de las propiedades neurotóxicas del QUIN y especulan acerca de su participación en enfermedades neurodegenerativas (Schwarcz, 1984). El mecanismo propuesto por medio del cual el QUIN ejerce sus efectos tóxicos en SNC involucra la activación de los receptores para el NMDA y un consecuente incremento en la permeabilidad de calcio. De esta manera, los niveles de glutatión podrían verse reducidos por la interacción del QUIN con las neuronas y con las células gliales, de tal manera que los niveles de GSH descendan.

La pérdida neuronal está acompañada por una proliferación glial donde el GSH y sus enzimas son altamente expresadas (Philbert y col., 1995). Las células gliales están de alguna manera encargadas de la protección neuronal por la liberación de GSH (Leslie y col., 1991). Sugerimos que en estudios crónicos la síntesis de GSH se debe a una gliosis provocada por la pérdida neuronal. Adicionalmente, se ha observado daño mitocondrial como una importante consecuencia de la deficiencia de glutatión en muchos tejidos (Meister et al., 1992). Algunos estudios han experimentado con la inhibición del metabolismo energético mitocondrial, lo que induce un incremento en el flujo de GSH hacia las neuronas dado por la pérdida de ATP y una falla en el

mantenimiento de la concentración del gradiente iónico (Zeevalk et al., 1998). Otros estudios muestran una posible cadena de eventos que involucran receptores NMDA que podrían inducir el incremento de la actividad de caspasas, así como disminución intracelular de GSH, incremento de estrés oxidativo y finalmente apoptosis (Wallin et al., 1999). Tanto el 3-NP como el QUIN son capaces de inducir apoptosis, probablemente asociada a la disminución de GSH en las células neuronales. Tanto la inhibición de la recaptura de la cisteína, como la estimulación de sintasa del óxido nítrico y la disminución de GSH son efectos comunes de altos niveles de agonistas glutamatérgicos (Olanow, 1993; Murphi et al., 1990; Babu y Bawari, 1997; Pereira y Oliveira, 1997). Consecuentemente tanto el 3-NP de forma indirecta como el QUIN directamente actúan como agonistas glutamatérgicos, lo cual explica la disminución de GSH en nuestros modelos.

El GSH se encuentra asociado a diversas funciones, entre ellas la desintoxicación de xenobióticos vía conjugación enzimática, reducción de H_2O_2 y mantenimiento del estado tiol-disulfuro en las células (Kannan, 1992). También es conocido como el más abundante de los atrapadores de radicales libres en el organismo.

Otro mecanismo antioxidante en el interior celular encargado de proteger a la célula es la enzima glutatión peroxidasa (GPx), de la cual no encontramos cambios que pudieran ser generados por el QUIN, lo que sugiere un proceso de daño oxidativo no enzimático. Algunos otros estudios confirman que en el área estriatal, la actividad de GPx permanece sin cambios después de la lesión con QUIN (Cruz-Aguado, 2000; Rodríguez-Martínez et al., 2000). Aún cuando Lindeanu (1998) reporta que la administración de QUIN trae como consecuencia un incremento en la regulación de GPx por la activación en microglia, esto probablemente pueda ser observado en tratamientos crónicos con esta toxina.

Por su parte el 3-NP si produce un aumento significativo en la actividad de GPx estriatal, lo que sugiere una reducción en los niveles de H_2O_2 y otros peróxidos como respuesta al desequilibrio por la administración de 3-NP, aunque a las 6 horas la actividad de GPx sólo muestra una ligera tendencia de cambio. Se sabe que la GPx se encuentra ampliamente distribuida en el citoplasma neuronal, por lo que bien podría hacer frente a los cambios producidos por 3-NP, aumentando su actividad. En la mitocondria, esta enzima se encuentra en menor proporción y podría asociarse a mecanismos de defensa antiapoptótica mediada por daño mitocondrial por radicales libres similares a H_2O_2 y al radical hidroxilo (OH) (Bogdanov et al., 1998). La administración sistémica de 3-NP resulta en una degeneración progresiva en el sistema locomotor, parecida a la que se presenta en pacientes con EH (Borlogan et al., 1996). También se sabe que la mitocondria constituye la mayor reserva de especies reactivas del oxígeno (ROS), ya que el bloqueo selectivo de algún componente del complejo de la cadena respiratoria genera la formación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno, capaces ambos de atacar membranas mitocondriales, así como de combinarse con otro tipo de radicales libres para formar especies mucho más tóxicas, como el radical hidroxilo o el anión peroxinitrito. Por otro lado, sabemos que cerca del 2-5% del oxígeno utilizado en mitocondria es transformado, aparentemente por SOD-Mn a peróxido de hidrógeno y, que al parecer la GPx es la única capaz de reducir al peróxido de hidrógeno producido por la SOD-Mn en la mitocondria.

La superóxido dismutasa (SOD) se considera otro mecanismo de defensa antioxidante: tanto en forma de Mn-SOD (mitocondrial), como en su forma Cu/Zn-SOD (citoplásmica), la SOD reduce las concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ROS), como el superóxido, previniendo así el daño celular (Binieda et al., 1998). Para el caso del QUIN, a 2 horas después de su administración, se observó una disminución de la actividad Cu/Zn-SOD, pero no se observaron

cambios para Mn-SOD, lo que sugiere que el QUIN involucra un mecanismo de daño oxidativo preferentemente citoplásmico y no mitocondrial (Rodríguez-Martínez et al., 2000). Para el 3-NP ocurre una disminución significativa tanto a las 3 como a 6 horas de SOD-Mn y SOD-Cu/Zn, lo que sugiere tanto un mecanismo citoplásmico, como un mecanismo mitocondrial, como resultado de la potencia de la toxina, aunque actúa preferencialmente a nivel mitocondrial, y acaba involucrando eventos citoplásmicos como resultado de su mecanismo de acción que involucra directamente la inhibición del complejo II mitocondrial, y como resultado de esta inhibición hay una disminución de ATP y una activación subsecuente de receptores NMDA sensibles a voltaje, permitiendo así la entrada de calcio y provocando la generación de más radicales por activación de otras rutas metabólicas dependientes de calcio, induciendo así un mecanismo citoplásmico y mitocondrial. Noack, (1998) menciona que la Mn-SOD se encuentra confinada a neuronas mientras que Cu/Zn-SOD fue observada en células de astroglia 24 horas después de la administración de QUIN, lo que sugieren nuestros resultados, es que los cambios en las actividades de Cu/Zn-SOD se ven directamente afectados por células gliales, aunque ambas isoformas están destinadas a prevenir el daño oxidativo (Noack, 1998). También el incremento de Cu/Zn-SOD se ha asociado con una gran resistencia de daño mediado por radicales (Przedborki et al., 1996; Andrews et al., 1996), mientras que la Mn-SOD se encarga de remover el superóxido mitocondrial generado por el metabolismo normal (Chance et al., 1975; Turnes y Boveris. 1980). El incremento en los niveles de la actividad de Mn-SOD se ha reportado en relación a la resistencia de células expuestas a radiación e hipoxia (Wong, 1995; Yamashida et al., 1994).

Recientemente se ha reportado una disminución en la actividad de Mn-SOD mitocondrial en neuronas corticales como resultado de la toxicidad del glutamato (Li et al., 1998), misma que afecta la expresión de SOD-Cu/Zn y la sobrevivencia de las neuronas in vitro (Schwarcz et al.,

1984). En el caso de los ratones transgénicos, al igual que con QUIN a 2 horas, no se observaron cambios en la actividad de Mn-SOD a las 19 semanas de edad, pero a las 35 semanas, sí se encontró un ligero aumento. En contraste, la Cu/Zn-SOD muestra un aumento a las 19 semanas y una disminución a las 35 semanas, lo que sugiere un mecanismo de defensa citoplásmico inicial a las 19 semanas e involucra mecanismos mitocondriales energéticos a las 35 semanas. Esto concuerda con la evidencia de que la sobreexpresión de CuZn-SOD incrementa la sobrevivencia de neuronas in vitro y reduce la toxicidad de análogos de glutamato en ratones transgénicos (Schwarcz et al., 1998).

Por otro lado, el hinchamiento celular es uno de los cambios más comunes en el daño celular neuronal. Este hinchamiento es el resultado de la acumulación de agua en el citoplasma de la célula. Esta condición se conoce como presencia de edema y es el reflejo de el sistema de balance electrolítico de la célula nerviosa (involucrando función mitocondrial, sistema de ATP, bombas de sodio y la integridad de la membrana plasmática). Estos cambios neuronales normalmente se encuentran en situaciones tóxicas (Chang et al., 1993). Consecuentemente, las alteraciones encontradas en la actividad enzimática de la SOD (principalmente Mn-SOD) podrían modificar los cambios estructurales de la mitocondrial. Dentro se observa pérdida de crestas mitocondriales, rompimiento de membrana externa e hinchamiento (Chang et al., 1993). Nuestros datos muestran cambios poco evidentes para el caso del QUIN; no así para el 3-NP, donde se observa hinchamiento mitocondrial y pérdida de crestas mitocondriales, produciéndose este mismo patrón a las 35 semanas de edad en los ratones transgénicos.

Cada uno de estos marcadores de estrés oxidativo y los cambios observados en cada uno, con las diferentes toxinas, podrían deberse a mecanismos de acción propios de cada toxina y/o al grado de evolución de la enfermedad en el caso de los ratones transgénicos.

VIII. CONCLUSIONES

- La peroxidación de lípidos estriatal aumentó a las 3 y 6 horas para el caso del 3-NP, no así para el QUIN, que aumentó a las 3 horas pero no presentó cambios a las 6 horas, lo que sugiere que dicho marcador ya no se afecta a tiempos posteriores, y que en este momento ya no hay peroxidación lipídica pero sí probablemente se observaría en otros marcadores de estrés oxidativo para el QUIN.
- Tanto el 3-NP como el QUIN presentaron una disminución de GSH provocado por el incremento de estrés oxidativo inducido por las toxinas.
- El 3-NP muestra un aumento en la actividad enzimática de GPx a 3 las horas, por lo cual el mecanismo neurotóxico del 3-NP es mediado enzimáticamente contrario al QUIN.
- Los cambios generados en la actividad de las dos isoformas de la SOD y tanto en modelos farmacológicos como en el modelo transgénico, están relacionados a los patrones neurotóxicos específicos generados por cada toxina en el cerebro de ratas o a los mecanismos moleculares involucrados en el genoma de EH.
- Los cambios observados en la actividad de Mn-SOD a las 35 semanas en R6/1 sugieren que la expresión fenotípica de la enfermedad podría correlacionarse con las alteraciones bioquímicas que conducen a la activación de la SOD, involucrando directamente al estrés oxidativo en el genoma de EH.
- En particular, los cambios observados en ambas isoformas de la SOD en los modelos farmacológicos y a las 19 semanas en el modelo transgénico podrían corresponder a alteraciones en la fase aguda de EH.

- Los cambios mitocondriales podrían estar directamente asociados a los cambios observados en todos los marcadores de estrés oxidante utilizados en este trabajo, especialmente los cambios observados con el 3-NP
- El orden de potencia oxidativa observado con los diferentes fármacos, fue QUIN < 3-NP. Se requiere de estudios crónicos para extender el criterio comparativo a la fase crónica de la EH representada por los ratones transgénicos a las 35 semanas de edad.

IX. REFERENCIAS

- Andiné, P., Orwar, O., Jacobson, I., Sandberg, M y Hagberg, H. (1991). Extracellular acidic sulfur-containing amino acid and γ -glutamyl peptides in global ischemia: postischemic recovery of neuronal activity is paralleled by a tetrodotoxin-sensitive increase in cysteine sulfinate in the CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurochem* 57: 230-236.
- Akashi, M., Hachiva, M., Paquette, R., Osawa, Y., Shimizu, S y Suzuki, G. (1995). Irradiation increased manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts, possible mechanisms for its activation. *J. Biol.Chem* 270: 15864-15869.
- Alston T. A., Mela L and Bright H. J (1977). 3-nitropropionate the toxic substance of indigofera is suicide inactivator of succinate deshydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3767-3771.
- Aronin N., Chase K., Young C., Sapp E., Shwarcz C., Matta N., Kornreich R., Landwehrmeyer B., Bird E., Beal M. F., Vonsattel J. P., Smith T., Carraway R., Boyce F. M., Young A. B., Penney J.B and DiFiglia M. (1995). CAG expansion affects the expression of mutant huntingtin in the Huntington's disease brain. *Neuro*, 15: 1193-1291.
- Aquilonius, S. M y Sjostrom, R. (1971). Cholinergic and dopaminergic mechanisms in Huntington's chorea. *Life. Sci* 10: 405-414.
- Babu, G. N y Bawari, M. (1997). Single microinjection of L-glutamate induces oxidative estrés in discrete regions of rat brain. *Biochemistry and Molecular Biology International* 43: 1207-1217.
- Baker, R. (1993). Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep 3B. *Biochem. Biophys. Acta* 304: 53-57.
- Beal M. F., N. W. Kowall, D. W. Ellison, M. F. Mazurek, K. J. Swartz, and J. B. Martin. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168-1761.
- Beal M. F., Ellison D. W and Martin J. B. (1987). Inhibition in Huntington's disease. *J. Mind Behav.* 8: 635-642.

- Beal M. F., Ellison D. W., Mazurek M. F., Swartz K. J., Malooy J. R., Bird E. D. and Martin J. B (1988a). A detailed examination of substance P in pathologically graded cases of Huntington's disease. *J. Neurol. Sci.* 84: 51-61.
- Beal M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31: 119-130.
- Beal M. F., B. T. Hyman., Koroshetz W. (1991). Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease? *Trends Neurosci.* 16: 125-131.
- Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Kowall N. W., Miller J. M., Storey E., Srivastava R., Rosen B. R., Hyman B. T. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13: 4181-4192.
- Beal M. F. (1994). Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease *Curr. Opin. Neurol.* 7: 542-547.
- Beal M. F. (1995). Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Ann Neurol.* 38: 357-366.
- Bird E. D. and Iversen L. L (1977). Neurochemical findings in Huntington's chorea. In: *Essays in Neurochemistry and Neuropathology*, vol 1: pp 177-195.
- Bird, E. D. (1980). Chemical pathology in Huntington's disease. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* 20: 533-551.
- Brouillet , E., Conde, F., Beal, M. F. y Philippe, H. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology* 59: 427-468
- Bruyn. G.W. (1968). Huntington's chorea: historical, clinical and laboratory synopsis. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Pp 298-378. Eds P.J. Vinken and G.W. Bruyn. North-Holland. Amsterdam.
- Bruyn, R. P. M y Stoof, J. C. (1990). The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci* 95: 29-38.
- Buck S. H., Burks T. F., Brown M. R and Yamamura H. I.(1981). Reduction in basal ganglia and substantia nigra substance P in Huntington' disease. *Brain Res.* 209: 464-469.

- Burke J.R., Enghild J. J., Martin M.e., Jou Y. S., Myers R. M., Roses A. D., Vance J.M and Strittmatter W. J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Med.* 2: 347-350.
- Carrasco, L. H y Mukherjiu, C. S. (1986). Atrophy of hábeas striatum in normal male at risk of Huntington's chores. *Lancet (Letter)* 1: 1388-1389.
- Cicchetti F., Gould P. V y Parent A (1996). Sparing of striatal neurons coexpressing calretinin and substance P (NK1) receptor in Huntington'disease. *Brain. Res.* 730: 232-237.
- Coles C. J., Edmonson D. E and Singer T. P (1979). Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. biol. Chem.* 255: 4772-4780.
- Cooper, A. J y Kristal, B. S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem* 378: 793-802.
- Coyle J. T and R. Schwarcz. (1976). Lesions of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature.* 263: 244-246.
- Coyle J. T and P. Puttfarcken. (1993). Oxidative estress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Crow, J. P., Spruell, C., Chen, J., Gunn, C., Ischiropoulos, H., Tsai, M., Smith, G. D, Radi, R., koppernol, W y Beckman, J. S (1994). On the pH-dependent yield of hydrxyl radical products from peroxyxynitrite. *Free Rad Biol Med* 16:331-338
- Crow, J yy Beckman, J. (1995). The role of peroxyxynitrito in nitric oxide mediated toxicity. *Curr. Top. Microbiol. Inmunol* 196: 61-78.
- Cruz-Aguado, R., Francis-Turner, L., Carmen M, Díaz., Antúnez, I (2000). Quinolinic acid lesion induces changes in rats striatal glutathione metabolism. *Neurochemistry* 37: 53-60.
- Cang, W. L. (1993). Introduction to basic principles of neurocytology and general concepts on neuropathology. In: principles of neurotoxicology. Louis. W. Chang. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 88p.
- Doble A. (1995). Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. *Therapie* 50: 319-337.

- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozeris, B. a., DiFligia, M., Shrp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L., Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Cell* 90: 537-548.
- Del Maestro, R y McDonal, W. (1989). Subcellular localization of superoxide dismutase, glutathione preoxidase and catalase in developing rat cerebral cortex. *Mech Ageing Dev* 48: 15-31.
- DiFligia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarcz, C., Meioni, A., Young, C., Martin, E., Vonsatlel, J. P., Caarraway, R., Ree ves, S. A., Boyce, F. M., Aroni, A. (1995). Huntington's a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14: 1075-1081.
- Dugan L. L., S. L Sensi., L. M Canzoniero., S. D Handran, S. M. Rothman., T-S Lin., M. P Goldberg, and D. W Choi. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical nertons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15: 6377-6388.
- Fahey, R. C y Sundquist, A. R. (1991). Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol* 64: 1-53.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Beal, M. F. (1985). Selective sparing of a clases of striatal neurones in Huntington's disease. *Science* 230: 561-563.
- Ffrench-Mullen J. M: H., Hori N and Carpenter. D: O. A. (1986). Comparison of the effects of quinolinate and N-methyl-D-aspartate on neurons of the piriform cortex, *Neurosci. Lett.*, 63: 66-70.
- Foster A. C., Vezzani A., French E: D and Shwarcz R.(1984). Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 48: 273-278.
- Foster A: C., Gill R and Woodruff G. N. (1988). Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 8: 4745-4754.

- Furata, A., Prince, D., Pardo, C., Torncoso, J. ., Xu, Z., Taniguchi, N., Martin, L. (1995). Localisation of superoxide dismutase in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus. *Am. J. Pathol* 146: 357-367.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem* 44: 147-159.
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem* 264: 7761-7764.
- Gayle, J. S.(1978). Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. *J. Neurochem* 30: 633-634.
- Geddes, J. W., Bondada, V y Pang, Z. (2000). Mechanism of 3-nitropropionic acid neurotoxicity: Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders. Humana Press Totowa, New Jersey. 107-120.
- Goldberg Y. P., Nicholson D.W., Rasper D. M., Kazemi-Esfarjani P., Thornberry N. A., Vaillancourt J. P and Hayden M. R. (1996b). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genet.* 13: 442-449.
- Gould D. H and Gustine D. L (1982). Basal ganglia degeneration myelin alterations enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropionic acid. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8: 377-393.
- Gould H., Wilson M. P and Hamar D. W. (1985). Brain enzyme and clinical alterations induced in rats and mice by nitroaliphatic toxicants. *Tox Lett.* 27: 83-89.
- Gourfinkel, A. I., Cancel,G., Trottier, Y., Devys, L., Tora, L., Lutz, G., Imberts, F., Saudou, G.,Stevanin, Y., Agig, Y., Brice, A., Mandel, J. L y Hirsch, E. C. (1997). Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain. *Ann. Neurol* 42: 1161-1167.
- Greene J. C and J. T Greenamyre. (1995). Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 64: 430-436.
- Griffith, O. W.& Meister, A. (1985). *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4668-4672.
- Gusella, J. F., McDonal, M. E., Ambrose, C. M., y Duyao, M. P. (1993). Molecular genetics of Huntington's disease. *Arch. Neurol* 50: 1157-1163.

- Hamilton B. F and Gould D. H. (1987a). Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 72: 286-297.
- Hamilton B. F and Gould D. H (1987). Correlation of morphological brain lesions with physiological alterations and blood brain barrier impairment by 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 74. 67-74.
- Hassel, B y Sonnewald, U. (1995). Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid in vivo. *J. Neurochem* 65:1184-1191.
- Harper. P. S (Ed) (1991). *Huntington's Disease*. WB Saunders. London.
- He F., Zhagang S., Qian F and Zhang C. (1995). Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid) *Neurology* 45: 2178-3183.
- Heales, S. J. R., Davies, S. E. C., Bates, T. E., Clark, J. B. (1995). Depletion of brain glutathione is accompanied by impaired mitochondrial function and decrease N-acetyl aspartate concentration. *Neurochem Res* 20: 31-38.
- Heales, S. J. R., Bolaños, J. P., Clark, J. B. (1996). Hlutathione depletion is accompanied by increased neuronal nitric oxide synthase activity. *Neurochem. Res* 21: 35-39.
- Hissing, P y Hilf. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Biochemistry* 74: 214-216.
- Huang, C. S., Chang, L. S., Anderson, M. E y Meister, A. (1993). Catalytic and regulatory proprieties of heavy subunit of rat Kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem* 268: 19675-19678.
- Huntington disease Collaborative Reseach Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983.
- Illarioshkin S. N., Igarashi sS., Onodera O., Marcoba E., Nikolskaya N., Tanaka H., Chabrashwili T.Z., Insarova N. G., Endo K., Ivanova-Smolenskaya I. A and Tsuji S. (1994). Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease. *Ann.Neurol.* 36: 630-635.

- Kalchman M.A., Koide H.B., McCutcheon K., Graham R. Knichol K., Nisshiyama K., Kazemi-Esfarjani P., Lynn F. C., Wellington Cc., Metzler M., Goldberg Y. P., Kanazawua I Gietz R. D and Hayden M. R. (1997). HHIP1, a human homolog of *S cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nature Genet.* 16: 44-53.
- Kannan, R. (1992). Transport glutathione al bloo-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 263(3): 964-970.
- Kawaguchi, T., Takeyasu, A., Matsunobu, K., Uda, T., Ishizawa, M., Suzuki, K., Nishiura, M., Ishikawa, M y Taniguchi, N. (1990). Stimulation of Mn-superoxide dismutase by tumor necrosis factor; cuantitative determination of Mn-SOD protein levels in TNF-resistant and selective cells by ELISA. *Biochem Biophys. Res. Commun* 171: 1378-1836.
- Koroshetz W. J., Jenkis B. G., Beal M. F, Rosen B. R (1992). Localizd proton- NMR spectroscopy in patients with Huntington's disease (HD) demonstrates abnormal lactate levels in occipital cortex: evidence for compromised metabolism in HD. *Neurology* 42: 319
- Kowall N. W., Ferrante R. J y Martin J. B. (1987). Patterns of cell loss in Huntington's disease. *TINS* 10: 24-29.
- Kremer. B., Weber B y Hayden M. R. (1992). New insights into the clinical features, patogénesis and molecular genetics of Huntington's disease. *Brain Pathol.* 2: 321-335.
- Kuida K., Zheng T. S., Na S., Kuan C. Y., Yang D., Karasuyama H., Rakic P and Flavell R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 368-372.
- Levine, M. S., Chesselot, M. F., Koppel, A., Gruen, E., Cepada, C., Carpenter, E. M., Zonjani, H., Hurst, R. S., Altenus, K. L., Murai, A., Efstratiatis, A y Zeitlin, S.(1998). Enhanced sensitivity to glutamate receptors activation in mouse models of huntington's disease. *Soc.Neurosci. Abstrac.* 380:7.

- Li, H., Shen, X. M y Dryhurst, G. (1998). Brian mitochondria catalyse the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT9 to intermediates that irreversibly inhibit complex I and escavenge glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem* 71: 20049-2062.
- Li X. J., Li S. H., Sharp A.H., Nucifora F. C., Schilling G., Lanahan A., Worley P., Snyder S. H and Ross A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378: 398-402.
- Li X. J., Sharp A. H., Li S. H., Dawson T. M., Snyder S. H and Ross C. A. (1996). Huntingtin-associated protein (HAP1): discrete neuronal localization resemble those of neural nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4839-4844.
- Lindenau, J., Noack, H., Asayama, K. (1998). Enhanced cellular glutathione preoxidase immunoreactivity in activated astrocytes and microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24: 252-256.
- Lipton S. A and P. A Rosenberg. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N. Engl. J. Med.* 330: 613-622.
- Liu Y. F., Deth R. C and Devys D. (1997). SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signalling complexes. *J. boil. Chem.* 272: 8121-8124.
- Lowry. O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. (1951). Protein measurement with the folin-fenol reagent. *J. Biochem* 193: 265-275.
- Lu, Y. M., Zhang, J. Y., Zhao, F. Q. (1991). Effects of calcium antagonists on glutamate release and calcium influx in the hippocampus with in vivo intracerebral microdialysis. *Br. J. Pharmacol* 104: 222-226.
- Ludolph. A. C., He F., Spencer P. S., Hammerstad J and Sabri M. (1991). 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* 18: 492-498.
- Macho, A., Hirsch, T., Marzo, I., Marchetti, P., Dallaporta, B., Susin, S. A., Zamzami, N y Kroemer, G. (1997). Glutathione depletion is an early and calcium elevation is late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol* 158: 4612-4619.

- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S. W y Bates, G. P. (1996). Exon 1 of the gene with expanded CAG repeats is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87: 493-506.
- MarKlund, S. (1978). Purification and characterization of manganese containing superoxide dismutase from bovine heart mitochondria. *Int. J. Biochem* 9: 299-306.
- Matsuda, Y., Higashiyama, S., Kijima, Y, Suanki, K., Kawano, K., Akiyama, M., Kawata, S., Tauri, S., Deutsch, H y Tanguchi, N. (1990). Human liver manganese superoxide dismutase: Purification and crystallization, subunit association and sulphhydryl reactivity. *Eur. J. Biochem* 194: 713-720.
- Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Research* 54: 1969-1975.
- Melamed, E. (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.
- Merad-Boudia, M., Nicole, A., santiard- Bron, D., Saille, C y Cevallos-Picot, I. (1998). Mitochondrial impairment as an early in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol* 56: 645-655.
- McCord, J. M., Boyle, J. A., Day, E., Rizzola, L. J y Salin, M. L. A. (1977). Manganese containing superoxide dismutase from human liver. In superoxide and superoxide dismutase (AM Michelson, HM McCord y I. Fridovich. Eds) 129-138. Condon Press.
- McGeer E. G. and McGeer P. L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injection of glutamic and kainic acid. *Nature* 263: 517-519.
- McGerr E. G., P. L Mcgeer, and K. Singh. (1978). Kainate induced degeneration of neostriatal neurons: Dependency upon corticostriatal tract. *Brain res.* 139: 381-383.
- Mills, G. C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol.Chem* 229: 189.

- Moroni F., Lombardi G., Monet G and Aldino C.(1984). The excitotoxine quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content increases during the ageing process. *Neurosci. Lett.* 47: 51-55.
- Myers R. H., Vonsattel J. P., Stevens T. J., Cupples L. A., Richardson E. P., Martin J. B y Bird E. D. (1988). Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38: 341-347.
- Murphy, T. H., Schnaar, R. L., Coyle, J. T. (1990). Immature cortical neurons are uniquely sensitive glutamate toxicity by inhibition of cysteine uptake. *FASEB Journal* 4: 1624-1633.
- Nasir, J., Floresco, S., O'Kusky, s., Diewert, R., Ritchman, M., Zetsier, M., Borowski, J., Marth, J., Phiñips, A., Hayden, M. (1995). Target disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioural and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81: 811-823
- Noack, H., Lindenau, J., Rthe, F., Asayama, K., Wolf, G. (1998). Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glia compartments in the cours of excitotoxically mediated neurodegeneration: Relation to oxidative and nitregeric stress. *Glia* 23: 285-297.
- Novelli A., Reilly J. A., Lisko P. G and Henneberry R. C.(1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451: 205-212.
- Oberley, L. W., Spitz, D. R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue, *Methods Enzymol* 105: 457-464.
- Olanow, C. W. (1993). A radical hipótesis for neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* 16: 39-44.
- Olney J. W. (1969). Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Orwar, O., Li, X., Andiné, P., Bergström, C. M., Hagberg, H., Folestad, S y Sandberg, M. (1994). Increased intra- and extracellular concentrations of γ -glutamylglutamate and related dipeptides in the ischemic rat striatum: involvement of glutamyl transpeptidase. *J. Neurochem* 63: 1371-1376.

- Panfili, E., Sandri, G, y Ernest, L. (1991). Distribution of glutathione peroxidase and glutathione reductase in rat brain mitochondrial. *FEBS Lett* 290:35-37.
- Paxinos, G, y Watson, G. (1984). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Pereira, C. M. F., Oliveira, C. R. (1997). Glutamate toxicity on PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 637-647.
- Pérez-severiano, F., Escalante, B., Ríos, C. (1998). Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem. Res* 23: 1297-1302.
- Perkins M. N and Stone T. W. (1983). Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res.* 259: 172-176
- Philbert, M. A., Beiswanger, C. M., Manson, M. M., Green, J. A., Novak, R. F., Primario, T., Reuhl, K. R., Lowndes, H. E. (1994). Glutathione S-transferases and γ -glutamyl transpeptidase in the rat nervous system: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants. *Neurotoxicology* 16: 349-362.
- Pileblad, E., Magnuson, T., Forntedt, B. (1989). Reduction of brain glutathione by (SCAP)L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depletion action of 6-hydroxydopamine in rat striatum. *J. Neurochem* 52: 978-980.
- Portera-Cailliau, C., J. C. Hedreen, D. L. Price V. E. Koliatsos. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15: 3775-3787.
- Ríos, C y Santamaría, A. (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Es* 16: 1139-1143.
- Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P. D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, D., Galván-Arzate., Santamaría, A. (2000). Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Research* 858: 436-439.
- Rodríguez, E., Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Barroso-Moguel, R., Rodríguez, F., Ríos, C., Santamaría, A. (1999). Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid rat hábeas striatum. *Toxicology* 139: 11-118.

- Santamaria, A y Ríos, C. (1993). MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid induced lipid peroxidation in rat hábeas striatum. *Neurosci. Lett* 159: 51-54.
- Sapp, E., Shwarcz, C., Chase, K., Bhide, P. G., Young, A. B., Penney, J., Vonsattel, J. P., Aroni, N y Diffligia, M. (1997). Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann. Neurol* 42: 549-558.
- Sato, S., Gobbel, G. T., Honkaniemi, J. (1997). Apoptosis in the striatum of rats following intraperitoneal injection of 3-nitropropionic acid. *Brain Res* 745: 343-347.
- Schulz J. B., D. R. Henshaw., D. Siwek., B. G. Jenkins., R. J Ferrante., p. B Cipolloni., N. W. Kowall., B. R. Rosen and M. F. Beal. (1995). Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivi. *J. Neurochem.* 64: 2239-2247.
- Schwarcz, R and kohler C. (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 38: 85-90.
- Schwarcz, R., Whetsell W. O and Mangano R: E. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that can produce axon sparing lesions in rat brain. *Science*, 219: 316-318.
- Schwarcz, R. (1984). Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* 35: 19-32.
- Schwarcz, R., Okuno, E., White, R. J., Bird, E. D y Whetsell, W. O. (1988). 3-Hidroxyanthanilic acid oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 164-169.
- Schwartz, J. P., Reaume, A., Scot, Rcoyle, T. J. (1998). Effects of over-and under-expression of Cu,Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brin Research* 789: 32-39.
- Shivakumar, B. R., Kolluri, S. V y Ravindranath, V. (1995). Glutathione and protein tilo homeostasis in brain during reperfusion after cerebral ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 274: 1167-1173.
- Sieradzan, K. A., Mechan, A. O., Jones, L. (1999). Huntington's disease intracellular inclusions contain truncated ubiquitinated Huntintin protein. *Exp. Neurol* 156: 92-99.

- Spokes E. G. S (1980) Neurochemical alterations in Huntington's chorea a study of post-mortem brain tissue. *Brain*, 103: 179-210.
- Stanislav, S., Stastny, F., platenik, J., Crkovsca, J., Zima, M.(1996). The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation in dependent on iron. *Neurochem. Int* 30: 233-237.
- Stone T. W.(1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenine acids. *Pharmacol. Rev.* 45: 309-379.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1990). A novel gen containing a trinucleotide repeat that is expanded an unstable on Huntingto's disease chromosomes. *Cell* 72: 974-983.
- Storey E. and Beal M. F (1993). Neurochemical substrates of rigidity and chorea in Huntington's disease. *Brain*. 116: 1201-1222.
- Vender A. D.(1975). The kynurenine pathway of tryptophan metabolism. In: John Wiley and Sons (Eds.) *Amino acid metabolism*. John-Wiley& Sons. U: S: A: 172-177.
- Van den Dobbelsteen, D. J., Nobel, C. S. I., Schelegel, J., Cotgreave, I. A., Orrenius, S y Slater, A. F. (1996). Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J. Biol. Chem* 271-15420-15427.
- Visner, G. A., Block, E. R., Burr, I M y Nick, H. S. (1991). Regulation of manganese superoxide dismutase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol* 260 Lung. Cell. Mol. Physiol. 4: L444-L449.
- Vonsattel J. P. G., Myers R. H., Stevens T. J., Ferrante R. J., Bird E. D y Richardson e. P. Jr (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 559-577.
- Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Hackman, A. S., Margolis, R. L., Trifiro, M. A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G. S., Propp, S. S., Bronum, M., Rowlan, K. J.(1998). Caspase clavage of gene products associates with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing polyglutamine tract. *J. Biol. Chem* 273: 91-58-9167.
- Weisiger, R. A y Fridovich, I (1973). Superoxide dismutase, organelle specificity. *J. Biol. Chem* 248: 3582-3592.

- Weiss. (1990). The calcium channel blockade of excitatory amino acid receptors. In excitatory amino acid in health and disease, edited by D. Lodge: 13-45. John Wiley, London, U. K.
- Wolfensberg M., Amsler U., Cuenod M., Foster A. C., Whetsell W. O. Jr y Schwarcz R.(1984). Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.* 41: 247-251.
- Wong-Riley, M. T. T. (1989). Cytochrome oxidase: as endogenous metabolic marker for neural activity. *Trends Neurosci* 12: 94-101.
- Zafar, I. A., Halliwell, B y Peter, J.(2000). No evidence for Increased Oxidative Damage to Lipids, Proteins, or DNA in Huntington's Disease. *Journal of Neurochemistry* 75(2): 840-846.
- Zenth, S., Liu, J., Chapman, D., Estratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genet* 11: 155-163.

X.- ANEXO

Short communication

Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum

Erika Rodríguez-Martínez ^a, Alberto Camacho ^a, Perla D. Maldonado ^b, José Pedraza-Chaverri ^b, Daniel Santamaría ^c, Sonia Galván-Arzate ^a, Abel Santamaría ^{a,*}

^a Department of Neurochemistry, National Institute of Neurology and Neurosurgery Manuel Velasco Suárez, SSA, Av. Insurgentes Sur # 3877, Mexico City 14269 Mexico

^b Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

^c Laboratory of Neurochemistry, National Institute of Pediatrics, SSA, Mexico City, Mexico

Accepted 7 December 1999

Abstract

The response of endogenous antioxidants to the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist and excitotoxin, quinolinic acid (QUIN), was investigated in rat corpus striatum. Animals treated with QUIN (240 nmol/ μ l), were sacrificed at 120 min after a single intrastriatal injection to examine the alterations in the levels of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, and the activities of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (Gpx). Changes in the rate of lipid peroxidation (LP) were also measured after exposure to different doses of QUIN (60, 120, 240 and 480 nmol/ μ l) as an index of oxidative stress. When compared to control, lipid peroxidation was increased at QUIN doses of 240 and 480 nmol/ μ l. Striatal levels of GSH and GSSG were decreased and increased, respectively, after QUIN injection; whereas Gpx activity was unchanged. Cytosolic copper/zinc SOD (CuZn-SOD) activity decreased after treatment, while mitochondrial manganese SOD (Mn-SOD) was unchanged. The alterations observed on these antioxidant systems suggest that QUIN toxicity is mediated by specific mechanisms leading to oxidative stress. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Quinolinic acid; Superoxide dismutase; Glutathione; Glutathione peroxidase; Corpus striatum

Quinolinic acid (QUIN), an endogenous glutamate agonist with relative selectivity for the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor [20], causes neuronal degeneration in specific regions of the mammalian brain [2]. Excitotoxic events observed after sustained activation of NMDA receptors by QUIN are related to elevated cytosolic concentrations of free Ca²⁺, ATP exhaustion and the processes thereafter [15]. In addition, we have previously reported the capability of QUIN to stimulate lipid peroxidation in rat brain under *in vitro* and *in vivo* conditions [12,13], which is also believed to be associated with iron ions [19]. These findings have suggested the involvement of free radicals and oxidative stress in the pattern of toxicity elicited by QUIN in the nervous system. Free radicals are currently generated as by-products of cellular enzymatic reactions such as mitochondrial respiration, phagocytosis, trichionate metabolism, etc. Endogenous antioxidants

such as reduced glutathione (GSH), and free radical scavenging enzymes: superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) play an important role in the intracellular defense against oxygen radical damage [18].

In this work we investigated the response of some endogenous antioxidants from rat corpus striatum to acute intrastriatal exposure to QUIN. Bred-in-house adult male Wistar rats (250–300 g) were used in this study. Animals were housed four per cage under controlled environmental conditions with food and water supplied *ad libitum*. Rats ($n = 5–9$ per group) were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*) and then received stereotaxic injections of QUIN (60, 120, 240 or 480 nmol/ μ l) into their right corpora striata. Stereotaxic coordinates were 0.5 mm anterior to bregma, 2.6 mm lateral to bregma, and 4.5 mm ventral to the dura, according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson [10]. Control animals received phosphate-buffered saline (pH 7.4). Rats were sacrificed by decapitation at 120 min postinjection. Brains were immediately removed, placed on ice and right corpora striata were then dissected and homogenized either in phosphate-

* Corresponding author. Fax: +52 5528 0095; e-mail: bels@fourier.facmed.unam.mx

buffered saline (pH 7.0) for lipid peroxidation (LP) and glutathione measurements, or in 9 ml/g tissue of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)/Triton X-100 (1%) for enzyme activity assays. Aliquots were then preserved fresh until their experimental analysis.

For determination of LP (a current index of oxidative stress), we used a modified method of chloroformic extraction based on the detection of fluorescent pigments derived from peroxidized lipids [13]. Tissue aliquots (1 ml) were added to 4 ml chloroform–methanol mixture (2:1, v/v). After phase separation, luminescence of the chloroformic layers were measured in a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrophotometer at 370 nm of excitation and 430 nm of emission wavelengths. Results were expressed as units of relative fluorescence intensity (RFI) per gram of tissue.

Levels of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were both determined by fluorometric detection after incubation with *o*-phthalaldehyde (OPA) as described before [5]. GSSG was differentiated from GSH using *N*-ethylmaleimide (NEM) in order to prevent GSH oxidation. Total superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by the method based on reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) in the presence of O_2^- generators [9]. Manganese SOD (Mn-SOD) was differentiated from copper/zinc SOD (CuZn-SOD) using 5 mM KCN in a reaction mixture that selectively inhibits CuZn-SOD [6]. One unit of SOD is defined as that amount to produce 50% inhibition of the initial rate of NBT reduction during 60 min. Glutathione peroxidase (Gpx) activity was determined

according to the method described by Hafeman et al. [3] based on nonenzymatic GSH oxidation and detection by spectrophotometer at 412 nm after incubation with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). An enzyme unit of activity was defined as a 50% decrease of GSH per 60 min after the decrease in GSH of the nonenzymatic reaction was subtracted. Protein concentrations were determined according to the method described by Lowry et al. [8]. Data were analyzed using either nonpaired *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for control and group comparisons. Results were expressed as mean \pm S.E.M. The levels of statistical significance were set at $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

Lipid peroxidation increased significantly at QUIN doses of 240 and 480 nmol/ μ l (72% and 78%, respectively) (Fig. 1). No significant changes were found on LP at 60 or 120 nmol/ μ l (Fig. 1). Treatment with 240 nmol/ μ l QUIN also caused 57% decrease in GSH and 141% increase in GSSG (Table 1). No changes were observed either on GPx (Table 1) or mitochondrial Mn-SOD (Fig. 2) activities in the striatum of QUIN-treated rats, while cytosolic CuZn-SOD activity decreased significantly (30%) as compared with control animals (Fig. 2).

There are some reports in literature discussing the role of free radicals in QUIN-induced neurotoxicity and lipid peroxidation [12–14,19], largely involving increased cytosolic calcium concentrations and nitric oxide associated toxicity [11]. In the present study, QUIN-induced lipid peroxidation was increased in a dose-dependent manner. We also demonstrated that QUIN-induced striatal oxida-

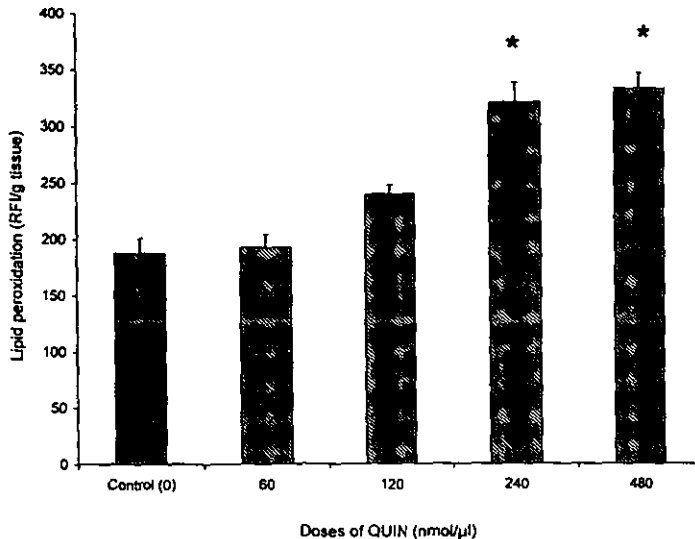


Fig. 1. Effect of increasing doses of quinolinic acid on lipid peroxidation (relative fluorescence intensity units per g of tissue) in rat corpus striatum. Animals received a single unilateral injection of QUIN into the right striatum and LP was measured two hours later. Each value is mean \pm S.E.M. derived from 5–9 animals/group. * $p < 0.05$, significantly different from control group; one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Table 1

Effect of intrastriatal injections of quinolinic acid (240 nmol/ μ l) on the levels of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione and the glutathione peroxidase (GPx) activity in rat corpus striatum. Data are mean \pm S.E.M.; $n = 5-9$ per group.

Treatment	GSH nmol/mg protein	GSSG	GPx activity (U/mg protein)
Control	9.91 \pm 0.45	0.49 \pm 0.01	33.30 \pm 2.20
QUIN	4.27 \pm 0.83*	1.18 \pm 0.04*	34.32 \pm 2.25

* $p < 0.01$, significantly different from control group; nonpaired t -test.

tive injury in rats is mediated by alteration of some primary antioxidant systems, such as glutathione (GSH) and cytosolic CuZn-superoxide dismutase.

So far, it is also clear that the well-known antioxidant enzymes CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase can both reduce concentrations of ROS, superoxide anions and hydrogen peroxide, preventing cell damage [1]. Recently, it has been reported that reduced mitochondrial Mn-SOD activity exacerbates glutamate toxicity in cortical neurons [7], whereas the overexpression of CuZn-SOD increases the antioxidant status and survival of neurons *in vitro* [16] as well as reduces the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum [17]. The findings of this work suggest that an immediate characteristic of the intrastriatal toxicity of QUIN involves cytoplasmic, but not mitochondrial oxidative injury, since CuZn-SOD activity decreased while Mn-SOD remained unchanged.

On the other hand, the tripeptide glutathione, the non-specific endogenous mitochondrial and cytosolic antioxidant, fulfills a variety of physiological functions, such as the reduction of various peroxides and free radicals [4], thereby resulting in the enzymatic (via GPx) or nonenzymatic conversion of GSH to GSSG. The thiol/disulfide (GSH/GSSG) ratio has therefore an important effect on the redox status of the protein thiols with modulation of protein conformation and enzyme activity. Moreover, oxygen-derived free radicals may overwhelm the radical scavenging potential of nerve cells, leading to lipid peroxidation and destruction of cell membranes, which in turn may result in cellular depletion of GSH, with subsequent increases of GSSG [4]. The altered levels of both GSH and GSSG induced by QUIN in this work reflects the capability of this neurotoxin to exert its action directly on the primary antioxidant systems such as GSH via an *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated mechanism [13]. The lack of effect of QUIN on GPx in our experiments suggest that conversion of GSH to GSSG might be a nonenzymatic event.

In summary, the present findings demonstrate that intrastriatal administration of quinolinate selectively modifies the activities of some endogenous antioxidants, suggesting generation of free radicals by specific depletion of the cytosolic free radical-scavenger enzyme CuZn-SOD activity, which in turn may explain the specific pattern of toxicity exerted by QUIN to produce generalized oxidative stress. Moreover, lower levels of GSH can be associated

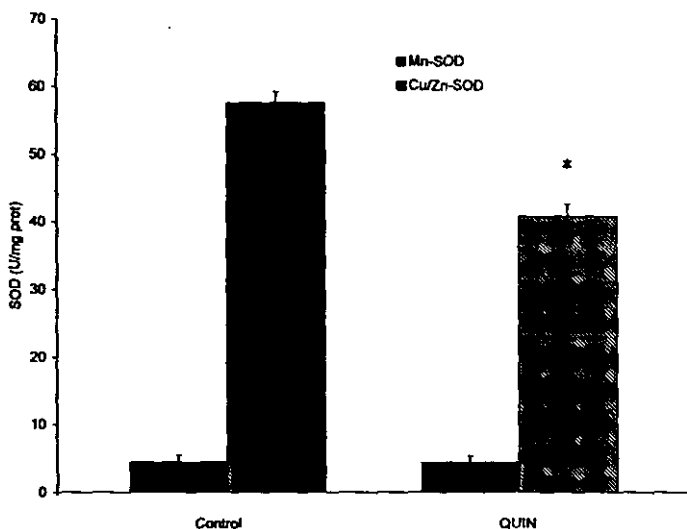


Fig. 2. Effect of quinolinic acid intrastriatal injection (240 nmol/ μ l) on copper/zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) and manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) activities (Units per mg of prot) in the rat corpus striatum. Animals received a single unilateral injection of QUIN into the right striatum and enzymes activity was measured 2 h later. Each value is mean \pm S.E.M. derived from 5–9 animals/group. * $p < 0.01$, significantly different from control group; nonpaired t -test.

with GSH decrease due to annihilation reaction with reactive oxygen species. Consequently, in this work, higher levels of GSSG can be associated with increased ratio of GSH oxidation via nonenzymatic dissociation of thiol groups. This study also confirms that QUIN-induced striatal neurotoxicity is mediated, at early stages, via oxidative stress, affecting primary antioxidant defense systems.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT Grant J28612-M and DGAPA Grant IN203797. The authors wish to express gratitude to Leticia Andrés-Martínez for her excellent technical assistance.

References

- [1] Z. Binienda, C. Simmons, S. Hussain, W. Slikker Jr., S.F. Ali, Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain, *Neurosci. Lett.* 251 (1998) 173–176.
- [2] A.C. Foster, R. Schwarcz, Neurotoxic effects of quinolinate in the mammalian central nervous system, in: T.W. Stone (Ed.), *Quinolinate and the Kynurenines*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, pp. 173–192.
- [3] D.G. Hafeman, R.A. Sunde, W.G. Hoekstra, Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat, *J. Nutr.* 104 (1974) 580–587.
- [4] P.R.C. Harvey, R.G. Ilson, S.M. Strasberg, The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector, *Clin. Chim. Acta* 180 (1989) 203–212.
- [5] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226.
- [6] J. Iqbal, P. Whitney, Use of cyanide and diethylthiocarbamate in the assay of superoxide dismutases, *Free Radical Biol. Med.* 10 (1991) 69–77.
- [7] Y. Li, J.C. Copin, L.F. Reola, B. Calagui, G.T. Gobbel, S.F. Chen, S. Sato, C.J. Epstein, Reduced mitochondrial manganese-superoxide dismutase activity exacerbates glutamate toxicity in cultured mouse cortical neurons, *Brain Res.* 814 (1998) 164–170.
- [8] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, L.J. Randall, Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [9] L.W. Oberley, D.R. Spitz, Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 457–464.
- [10] G. Paxinos, G. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney, 1984.
- [11] F. Pérez-Severiano, B. Escalante, C. Ríos, Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 1297–1302.
- [12] C. Ríos, A. Santamaría, Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 1139–1141.
- [13] A. Santamaría, C. Ríos, MK-801, a *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum, *Neurosci. Lett.* 159 (1993) 51–54.
- [14] D. Santamaría, V. Espinoza-González, C. Ríos, A. Santamaría, *N* ω -nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices, *Neurochem. Res.* 24 (1999) 843–848.
- [15] R. Schwarcz, A.C. Foster, E.D. French, W.O. Whetsell Jr., C. Kohler, Excitotoxic models for neurodegenerative disorders, *Life Sci.* 95 (1984) 29–38.
- [16] P.J. Schwartz, J.T. Coyle, Effects of overexpression of the cytoplasmic copper-zinc superoxide dismutase on the survival of neurons in vitro, *Synapse* 29 (1998) 206–212.
- [17] P.J. Schwartz, A. Reame, R. Scott, J.T. Coyle, Effects of over- and under-expression of Cu, Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum, *Brain Res.* 789 (1998) 32–39.
- [18] B.K. Siesjö, C.D. Agardh, F. Bengtsson, Free radicals and brain damage, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1 (1989) 165–211.
- [19] S. Stipek, F. Stasny, J. Pláteník, J. Crkovská, T. Zima, The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron, *Neurochem. Int.* 30 (1997) 233–237.
- [20] T.W. Stone, Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids, *Pharmacol. Rev.* 45 (1993) 309–379.

Comparative Analysis of Superoxide Dismutase Activity Between Acute Pharmacological Models and a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease

Abel Santamaría,¹ Francisca Pérez-Severiano,^{1,2} Erika Rodríguez-Martínez,¹ Perla D. Maldonado,³ José Pedraza-Chaverri,³ Camilo Ríos,¹ and José Segovia^{2,4}

(Accepted March 7, 2001)

We examined the activity of striatal superoxide dismutase (SOD) in two acute pharmacological models of Huntington's Disease (HD), and compared it with SOD activity in the striata of mice transgenic for the HD mutation. Total SOD, and Cu/ZnSOD activities increased in young transgenic mice, but decreased in older (35 week) mice. We consider that the increased enzyme activity represents a compensatory mechanism to protect cells from free radical-induced damage, but the system becomes insufficient in older animals. Major decreases in SOD activity were also observed both after quinolinic acid and 3-nitropropionic acid intrastriatal injections. The present results indicate that in both types of HD models striatal oxidative damage occurs, and that it is associated with alterations in the cellular antioxidant system.

KEY WORDS: Striatum; oxidative damage; free radicals; excitotoxins; transgenic; Huntington's disease.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is an autosomal hereditary neurodegenerative disorder characterized by motor, psychiatric, and cognitive symptoms (1). To mimic some of the biochemical, morphological and behavioral alterations of HD several acute animal models have been developed. Intrastriatal injection of glutamate analogs, such as kainic acid (2), ibotenic acid (3),

and quinolinic acid (4), or of a mitochondrial inhibitor, 3-nitropropionic acid (5), represent some of the best characterized models used in rodents.

More recently, however, a new system for modeling HD has emerged. The disease is caused by an abnormal expansion of the CAG repeats that code for a polyglutamine tract in a novel protein named huntingtin (6). The precise knowledge of the genetic defect responsible for the onset of HD has allowed the generation of transgenic animals, particularly mice, which express the HD mutation. Several of the transgenic mice lines present biochemical and morphological alterations in the striatum, and display progressive neurological phenotypes (7,8,9,10). Moreover, we have observed that there is a correlation between the onset of the neurological phenotype and striatal free radical-induced damage in one line of transgenic mice, R6/1 (11), that expresses a human mutated huntingtin exon 1 with 116 CAG repeats (7). These results, together with other experiments showing that mice transgenic for the HD mutation present a mitochondrial dysfunction

¹ Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, SSA, México 14629, D.F., México.

² Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, 07300, D.F., México.

³ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510, D.F., México.

⁴ Address reprint request to: Dr. José Segovia, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Avenida Instituto Politécnico Nacional # 2508, México, 07300, D.F. Tel: (525) 747-3800 • 5132; Fax: (525) 747-7105; E-mail: jsegovia@fisio.cinvestav.mx

(12), suggest that oxidative damage, likely caused by defects in the energy metabolism of striatal cells, is a contributing factor underlying the expression of the neurological phenotype of the mice. This is in agreement with the concept sustaining that impaired mitochondrial functioning and energy metabolism of striatal neurons are important components in the etiology of HD (13,14).

The biochemical and pharmacological modes of action of the toxins used in acute HD models are well established, however, these drugs have no direct bearing on the onset of the disease, and have an acute oxidative effect, whereas the human disease is a long-term neurodegenerative process. On the other hand, transgenic mice represent a chronic model that is directly related to the genetic and molecular origin of the disease, but the biochemical effects of the mutated protein are not completely understood. We considered that it would be relevant to compare the functioning of the principal cellular system of protection against oxidative stress, by assessing the activity of the two classes of superoxide dismutase (SOD), Cu/ZnSOD, mainly present in the cytosol, and MnSOD, the mitochondrial enzyme, among different HD animal models. Two well-established acute models of HD, and a transgenic model were used for the present experiments. We employed the intrastriatal injection of quinolinic acid (QUIN), an agonist to the NMDA receptor (4), and 3-nitropropionic acid (3-NPA), a mitochondrial inhibitor (5), and compared the effects of these toxins on SOD activity in the striata of rodents, with SOD activity in the striata of R6/1 HD transgenic mice. For the present work, we used rats for the lesion studies, because the biochemical effects of the lesions are well described, and because of our previous experience with these models, particularly regarding toxin dosage, and the time course of their acute effects (15,16). The previous information from rat experiments allowed us to extend the comparative analysis with the new data obtained from transgenic mice. Thus, our purpose is not try to compare effects on two different species, but rather to analyze how striatal neurons respond to two distinct insults that affect the neurons injured in HD. Since transgenic mice are becoming very relevant for HD research, the idea of also developing pharmacological models in mice, as has been done in rats and non-humans primates, could be of interest.

The direct comparison of the alterations in the main cellular system of protection against oxidative stress in the different models may thus shed new light regarding the mechanisms of action of diverse agents that damage the striatal neuronal population affected in HD. This knowledge may help us to draw a more

complete understanding of the factors involved in the deterioration process of these cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Transgenic Mice. Mice were genotyped as previously described (11). Briefly, R6/1 male mice, and nontransgenic B6CBA female mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), and a colony established in our vivarium (CINVESTAV-IPN). Mice were housed and kept under controlled temperature (20–22°C), with a regulated 12 h light/dark cycle and with ad libitum access to food and water. Transgenic male mice were backcrossed to non-carrying females, and the genotype of the mice determined by PCR. DNA was isolated from a sample of ear tissue, and PCR performed using conditions and primers described elsewhere (7). Transgenic mice and non-transgenic littermates were identified and used for the following experiments. R6/1 mice and non-transgenic littermates of different ages were sacrificed by cervical dislocation, the striata rapidly dissected on ice, and used for SOD activity assays.

Stereotaxic Injections. Male adult Wistar rats (250–300 g) were employed. Animals were housed under standard conditions with a 12 h light/dark cycle and ad libitum access to food and water. Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), and one μ l stereotaxical microinjections of either QUIN (240 nmol/ μ l) or 3-NPA (500 nmol/ μ l) were performed into the right striata. The doses of toxins have been previously used to reproduce relevant neurochemical and morphological features of HD (4,5,15,16). Stereotaxic coordinates were: 0.5 mm anterior to bregma; 2.6 mm lateral to bregma, and 4.5 mm ventral to dura, according to the Paxinos and Watson rat brain atlas (17). Control animals were injected with the same volume of PBS, pH = 7.4. Rats were sacrificed by decapitation at different times (180 and 360 min) after injection. Brains were removed and the right striata obtained as previously described. All animal procedures were approved by the Institutional Review Committee, and are in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

SOD Activity. Total SOD activity was determined according to the method of Oberley and Spitz (18). Briefly, a competitive inhibition assay was performed using a xanthine/xanthine oxidase system to reduce nitroblue tetrazolium (NBT). The mixture reaction contained: 0.122 mM EDTA, 30.6 μ M NBT, 0.122 mM xanthine, 0.006% bovine serum albumin, and 49 mM sodium carbonate, all final concentrations. Five hundred μ l of striatal homogenates (1:100) were added to 2.45 ml of the mixture described above, and then 50 μ l of xanthine oxidase, at a final concentration of 2.8 U/L, were added and incubated at 27°C for 30 min. Reactions were stopped with 1 ml of 0.8 mM cupric chloride, and optical density was recorded at 560 nm. Complete (100%) reduction of NBT was obtained when the sample was replaced with distilled water. The amount of striatal protein that inhibited 50% of maximal NBT reduction was defined as one unit of SOD activity. MnSOD activity was differentiated from Cu/ZnSOD activity, by inhibiting the later with diethyldithiocarbamate (DDC) (19). Therefore, to determine MnSOD activity, samples were incubated with 50 mM DDC at 30°C for 60 minutes, and then dialyzed for three hours with three changes of 400 volumes of 5 mM PBS (pH = 7.8)-0.1 mM EDTA. Cu/ZnSOD activity was obtained by subtracting the activity of the DDC treated samples, from that of total SOD activity. Results are expressed as Units/mg protein. Proteins were determined using the Folin and Ciocalteu's phenol reagent (20).

RESULTS

Our results show that there is an increase of 20.6% in total SOD activity in 19 week-old transgenic mice, compared to non-transgenic littermates. The increased activity is due to the Cu/ZnSOD isoform, that increased 23.4% compared to wild-type mice, and we found no change in the activity of MnSOD (Fig. 1). However, in 35 week-old mice the situation is reversed. At this time we observed a decrease in total SOD activity, which is due to a 23% decrease of transgenic mice Cu/ZnSOD, since MnSOD did not change compared to control mice (Fig. 1). These data suggest that the formation of free radicals, and oxidative stress, are playing a role in the expression of the neurological phenotype. On the acute pharmacological lesion models, we observe that QUIN induces a rapid decrease of SOD activity, which is caused by a decrease in Cu/ZnSOD activity, whereas there is no change in MnSOD (Fig. 2). Finally, 3-NPA, a mitochondrial toxin, induced a reduction in the activity of SOD, but in this case, both the Cu/ZnSOD and MnSOD isoforms activities decreased (Fig. 2). Taken together, these results indicate that in both types of HD models striatal oxidative damage may occur, and that it is associated with alterations in the endogenous cellular antioxidant systems.

DISCUSSION

SOD function is to protect cells from the presence of the superoxide radical, by generating H_2O_2 . It is likely that in 19 week-old R6/1 mice the increased activity of Cu/ZnSOD represents a compensatory response to generate H_2O_2 , and thus, to reduce the toxic effects of the superoxide anion, and the subsequent formation of peroxynitrite from O_2^- and NO. At this stage of the HD mutation-induced phenotype this mechanism appears to be sufficient to palliate oxidative damage, since lipid peroxidation (LP) remains similar to control non-transgenic mice, and the neurological phenotype is mild (11). In contrast, by 35 weeks of age the activity of Cu/ZnSOD diminishes in transgenic mice compared to wild-type animals. We could not detect changes in MnSOD activity between control and transgenic mice at the two ages tested. It appears as if Cu/ZnSOD is the principal responsible system for cellular anti-oxidant protection in HD transgenic mice, and that it can compensate for increased free radical formation in young animals, but the antioxidant system cannot respond appropriately in older mice, as Cu/ZnSOD

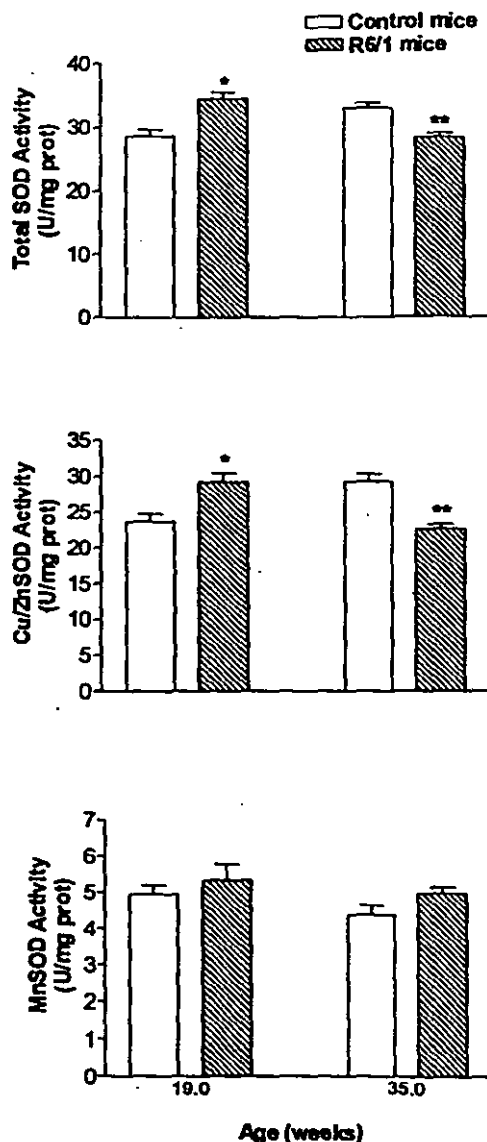


Fig. 1. Superoxide dismutase (SOD) activity in the striatum of transgenic R6/1 mice and wild-type control mice at different ages. Bars are means and SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ comparing transgenic mice with control mice, Student's t -test ($n = 7-10$ mice per group).

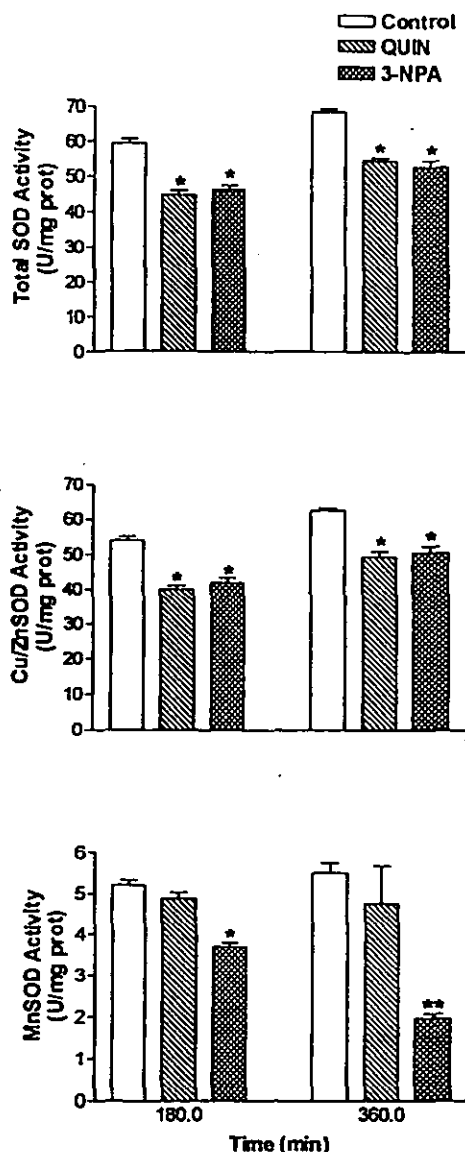


Fig. 2. Superoxide dismutase (SOD) activity in the striatum of rats at different times after the intrastriatal injection of QUIN or 3-NPA and sham-lesioned rats. Bars are means and SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, comparing lesioned animals with sham-lesioned controls, Student's *t*-test ($n = 5-9$ animals per group).

activity diminishes. The protective effect of Cu/ZnSOD has been demonstrated in neurons, where its overexpression increases antioxidant status and cell survival (21). The present results correlate with our previous findings that 19 week-old R6/1 mice show a mild neurological phenotype, and low LP damage, whereas 35 week-old mice present a severe phenotype, associated with very high levels of striatal LP (11). A previous report indicated that there was no statistically significant difference in total SOD activity between R6/1 and control mice, although a small 14% increase in SOD activity was observed in the striata of transgenic mice (22). In that report, 18 week non-symptomatic mice were used, whereas for the present experiments we employed 19 and 35 week old animals, which by 19 weeks already presented a mild neurological phenotype (11). In our colony, 15-old transgenic mice do not display any neurological phenotype, suggesting that perhaps the window at which symptoms appear and develop is rather narrow. We believe that the apparent discrepancy between our results and those of Hansson et al. (22), is likely due to the age of the mice used in the different experiments.

Our data suggest that it is likely that formation of free radicals, probably coming from the excessive formation of peroxynitrite from NO and superoxide, participates in the oxidative damage that underlies the expression of the neurological phenotype of the R6/1 transgenic mice. Besides our observation of increased LP in the R6/1 mice, mitochondrial abnormalities and activation of iNOS have been reported in R6/2 mice and HD patients (11,12,23). These data are consistent with the concept of oxidative damage in mice transgenic for the HD mutation.

Intrastriatal injections of the toxins also induced major changes in SOD activity. QUIN, a glutamate agonist, induces lesions where there is primarily degeneration of the medium-sized GABAergic spiny projection neurons (4,24). These lesions spare somatostatin, neuropeptide Y and NADPH-diaphorase containing interneurons, indicating that it is an accurate biochemical model of the disease (4,24,25). The data we present here, showing that QUIN induces a reduction in Cu/ZnSOD, but has no effect on MnSOD activity, are in agreement with our previous results (16), and indicate an association between Cu/ZnSOD failure and death of striatal neurons. We also demonstrate that 3-NPA induces decreases in the activity of both the cytosolic and mitochondrial classes of SOD, and we believe this is due to its mode of action. 3-NPA inhibits complex II of the respiratory chain, and causes a dose-dependent ATP

depletion, increased lactate concentration and selective striatal neuronal loss (5). These results suggest that the cell population primarily affected in HD is particularly sensitive to defects in energy metabolism. Accidental ingestion of 3-NPA in humans induces nausea, vomiting, encephalopathy, coma, and in surviving patients, choreiform movements and dystonia (26). All this information indicates that mitochondrial energy impairment induces severe alterations in striatal neurons. Taken together, our results suggest that irrespectively of the primary modes of action of the different toxins, they have a common pathway that causes major alterations in SOD activity, the primary antioxidant line of defense, which suggests that oxidative stress is implicated in striatal cellular damage.

The fact that even in severely impaired transgenic mice we can still detect lipid peroxidation (11), and SOD activity, suggests that in this model, the neurological phenotype appears to be related to cell dysfunction rather than with cell death. The observation, in a conditional model of HD transgenic mice, that it is possible to revert the neuropathology and motor phenotype already present in the mice (10), further supports this concept. This suggests that the R6/1 mice are an appropriate model to study, and to be compared, with a stage of HD prior to severe cell death and neurodegeneration. On the other hand, the acute pharmacological models induce rapid neuronal death, the final phase of HD neuropathology. However, in both types of striatal cell damage, oxidative stress is involved.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by CONACYT grants 33042-N (J.S.), and J28612-M (A.S.), and DGAPA (UNAM) IN203797 (J.P.-C.).

REFERENCES

- Harper, P. S. 1996. The natural history of Huntington's disease. Pages 123-136, in Harper, P. S. (ed.), *Huntington's disease 2nd edn*, WB Saunders, London.
- Coyle, J. T. and Schwarcz, R. 1976. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263:244-246.
- Schwarcz, R., Hokfelt, T., Fuxe, K., Jonsson, G., Goldstein, M., and Terenius, L. 1979. Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Exp. Brain Res.* 37:199-216.
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurk, M. F., Schwarcz, K. J., and Martin, J. B. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Brouillet, E., Jenkins, B. G., Hyman, B. T., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Srivastava, R., Roy, D. S., Rosen, B. R., and Beal, M. F. 1993. Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 60:356-359.
- The Huntington's disease collaborative research group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. *Cell* 72:971-983.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S. W., and Bates, G. P. 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Reddy, P. H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W. O., Jr., Miller, G., and Tagle, D. A. 1998. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat. Genet.* 20:198-202.
- Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D. J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X. J., Stevens, M. E., Rosemond, E., Roder, J. C., Phillips, A. G., Rubin, E. M., Hersch, S. M., and Hayden, M. R. 1999. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23:181-192.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- Pérez-Severiano, F., Ríos, C., and Segovia, J. 2000. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res.* 862:234-237.
- Tabrizi, S. J., Workman, J., Hart, P. E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. 2000. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann. Neurol.* 47:80-86.
- Beal, M. F. 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:211-223.
- Schapira, A. H. 1999. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biophys. Acta* 1410:159-170.
- Santamaría, A., Ríos, C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci. Lett.* 159:51-54.
- Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P. D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, D., Galvan-Arzate, S., and Santamaría, A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 858:436-439.
- Paxinos, G. and Watson, G. 1984. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Oberley, L. W. and Spitz, D. R. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105:457-464.
- Iqbal, J. and Whitney, P. 1991. Use of cyanide and diethylthiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic. Biol. Med.* 10:69-77.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Schwartz, P. J. and Coyle, J. T. 1998. Effects of over expression of the cytoplasmic copper-zinc superoxide dismutase on the survival of neurons in vitro. *Synapse* 29:206-212.
- Hansson, O., Petersén, Å., Leist, M., Nicotera, P., Castilho, R. F., and Brundin, P. 1999. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:8727-8732.
- Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L. A., Hersch, S. M., Hobbs, W., Vonsattel, J. P., Cha, J. H., and Friedlander, R. M. 2000. Minocycline

- inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6:797-801.
24. Beal, M. F., Ferrante, R. J., Swartz, K. J., and Kowall, N. W. 1991. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J. Neurosci.* 11:1649-1659.
25. Koh, J. Y., Peters, S., and Choi, D. W. 1986. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science* 234:73-76.
26. Ludolph, A. C., Spencer, P. S., Hammerstad, J., and Sabri, M. 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* 18:492-498.