

00524
186



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL SELENIO SOBRE
DIFERENTES INDICADORES DE NEUROTOXICIDAD INDUCIDOS POR
EL ÁCIDO 2, 3-PIRIDÍN DICARBOXÍLICO
(AC. QUINOLÍNICO) EN UN MODELO EXPERIMENTAL
DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON EN LA RATA**

**TESIS EXPERIMENTAL
MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A N:
VÁZQUEZ ROMÁN BEATRIZ
SANTIAGO LÓPEZ ALFONSO DARÍO**



MÉXICO, D. F.



**EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Francisco Hernández Luis

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Dr. Abel Santamaría Del Angel

1^{er} SUPLENTE: Profra. Ma. de L. Mayec Cruz

2^o SUPLENTE: Profra. Catalina Machuca Rodríguez

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores/Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía *Manuel Velasco Suárez*, México D.F., y en colaboración con el Neurochemistry Laboratory, Division of Neurotoxicology, National Center for Toxicological Research/Food and Drug Administration, Arkansas, E.U.A. (de Noviembre de 1998 a Octubre de 2002).



Dr. Abel Santamaría Del Angel



Vázquez Román Beatriz



Santiago López Alfonso Darío.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido fruto de un largo camino por aulas y laboratorios, y así mismo, por el respaldo de quienes nos apoyaron, damos las gracias:

A los maestros que además de inculcarnos el gusto de la ciencia, nos dieron cátedra de civismo, ética y valor aún entre esquiroles, amenazas y represión maestros, que hoy día por cierto, siguen batallando en la crisis actual.

Al Dr. Abel Santamaría Del Angel, nuestro tutor y amigo,

A Sonia Galván Arzate, por su *Santa* paciencia y amistad,

A nuestros colegas dentro del INNN, así como a los colegas de Neurotoxicología de la F.D.A., por su vallosa contribución a la realización de este proyecto.

c

DEDICATORIA

A Mis padres,

Quienes depositan su confianza en mí, sin desesperar y apoyándome siempre con amor.

A Mi hermana Berta,

Que ha caminado a mi lado, socorriéndome y alentándome en todo momento.

A Mi hermano Victor,

Con su ejemplo de mantener siempre una sonrisa y disposición a disfrutar la vida.

Y al Bich,

Que no permitió que quasi-enloqueciera en los momentos de posible frustración, alentándome a seguir como lo estoy haciendo, y permitiéndome contar con él en cualquier momento.

Con cariño y respeto

Beatriz Vázquez Román

DEDICATORIA

A mi madre Luisa López Pérez, a mi padre (Alfonso), mis hermanos (Jaime, Silvia, Elvis, Heber, Haideé), en especial a la "Pipo" y el "Chavito", que a pesar de todo insisten en seguir superándose,

A todos mis amigos (en especial al 6 de febrero del 2000), por que gracias a ellos seguimos trabajando,

A *Bety*, por que aunque esta dedicatoria no tenga el mismo valor que la publicación en el *Journal*, honor a quien honor merece,

A la *Dra. Paty*, y a la *Mtra. Carmelita*, y sus respectivas familias,

A aquellas personas que por un motivo u otro se quedaron en el camino,

A todos ellos vaya mi más profundo respeto y agradecimiento.

Alfonso Darío Santiago López

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| I. ANTECEDENTES | 3 |
| 1. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD)..... | 3 |
| 1.1. ANTECEDENTES ANATÓMICOS DE HD..... | 3 |
| 1.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS..... | 4 |
| 1.3. MODELOS EXPERIMENTALES FARMACOLÓGICOS DE HD..... | 5 |
| 2. ACIDO QUINOLÍNICO..... | 9 |
| 2.1. Y REPRODUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD..... | 9 |
| 2.1.1. GENERALIDADES DEL QUIN..... | 9 |
| 2.1.2. Y ASOCIACIÓN A PATOLOGÍAS HUMANAS..... | 10 |
| 2.1.3. Y DESTRUCCIÓN NEURONAL..... | 11 |
| 2.1.4. Y RECEPTORES NMDA..... | 11 |
| 2.1.5. Y LIPOPEROXIDACIÓN..... | 12 |
| 3. SELENIO..... | 13 |
| II. HIPÓTESIS | 18 |
| III. OBJETIVOS | 19 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| 4.1. REACTIVOS Y ANIMALES..... | 20 |
| 4.2. TÉCNICAS..... | 20 |
| 4.2.1. PRETRATAMIENTO DE LOS ANIMALES..... | 20 |
| 4.2.2. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS..... | 22 |
| 4.2.3. ACTIVIDAD DE GPx..... | 22 |
| 4.2.4. CONDUCTA DE ROTACIÓN..... | 24 |
| 4.2.5. CONTENIDO ESTRIATALES DE GABA..... | 25 |
| 4.2.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO..... | 26 |
| V. RESULTADOS | 28 |
| 5.1. PEROXIDACIÓN ESTRIATAL DE LÍPIDOS..... | 28 |
| 5.2. ACTIVIDAD ESTRIATAL DE GPx..... | 29 |
| 5.3. CONDUCTA DE ROTACIÓN..... | 30 |
| 5.4. NIVELES ESTRIATALES DE GABA..... | 31 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 5.5. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS..... | 32 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 33 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 37 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 38 |

ANEXO A:

| | |
|--|----|
| a) ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA HD..... | 56 |
| b) TRANSMISIÓN EXCITATORIA..... | 61 |
| i) CUERPO ESTRIADO..... | 61 |
| ii) CIRCUITERIA ESTRIATAL..... | 62 |
| iii) RECEPTORES TIPO NMDA..... | 65 |
| iv) GLUTAMATO..... | 66 |
| c) TRANSMISIÓN INHIBITORIA..... | 68 |
| i) ÁCIDO GAMMA-AMINOBUTÍRICO..... | 68 |
| ii) METABOLISMO DEL GABA..... | 68 |
| iii) RECEPTORES PARA GABA..... | 70 |

ANEXO B:

| | |
|--|----|
| a) ESTRÉS OXIDATIVO..... | 71 |
| i) RADICALES LIBRES..... | 71 |
| ii) ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO..... | 72 |
| iii) ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO..... | 73 |
| iv) DAÑO OXIDATIVO..... | 73 |
| v) PEROXIDACIÓN LIPÍDICA..... | 77 |
| b) MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE..... | 80 |

ANEXO C:

| | |
|---|----|
| BIOSÍNTESIS DEL QUIN POR LA VÍA DE LA KINURENINA..... | 84 |
|---|----|

RESUMEN

Entre los padecimientos neurodegenerativos que involucran daño oxidativo por formación de radicales libres se encuentra la enfermedad de Huntington (HD), padecimiento autosómico dominante que afecta a la población usualmente en la vida media (cuarta o quinta década de vida y progresión de entre 10 y 15 años), con una sintomatología progresiva de incapacidad física y mental. La HD afecta a hombres y mujeres con la misma frecuencia, y su expresión es de entre 5 a 10 individuos por cada 100, 000 en la población mundial (Connealy, 1984).

El ácido 2,3-piridín dicarboxílico (ácido quinolínic o QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptofano en la vía de la kinurenina y es un conocido agonista de receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Lapin, 1981b; Perkins y Stone, 1983; Schwarcz y cols., 1984) y reconocido modelo experimental de HD en roedores.

Por su parte, el selenio (Se), un componente esencial en la dieta, es un conocido antioxidante y actúa como factor catalítico de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), ejerciendo así una defensa contra los radicales libres y evitando el estrés oxidativo, por lo que juega un papel importante en la protección de lípidos de membrana y otros componentes. Además, se ha demostrado que animales deficientes en selenio presentan un abatimiento en la actividad de GPx, además de una degeneración de neuronas dopaminérgicas (Castaño y cols., 1993).

La finalidad de este proyecto es evaluar el posible efecto protector del selenio en un modelo experimental de la HD inducido *in vivo* por QUIN, abordando para ello diferentes marcadores de neurotoxicidad estriatal. Para ello, los animales fueron administrados con selenito de sodio (0.625 mg/Kg/día, i.p.) durante 5 días, y 2 horas después de la última administración, los animales recibieron una inyección estriatal unilateral de QUIN (240 nmol/ μ L). Dos horas después de la lesión con la toxina, se extrajo

el tejido estriatal y se midieron los diferentes parámetros de peroxidación lipídica y actividad de glutatión peroxidasa (Gpx). La conducta de rotación, el contenido estriatal de GABA, las alteraciones morfológicas, y la correspondiente tasa de daño neuronal fueron evaluados como marcadores adicionales de toxicidad del QUIN 7 días después de su inyección.

Nuestros resultados reflejan un efecto parcialmente protector del selenio, el cual disminuyó la lipoperoxidación e incrementó la actividad de GPx en ratas tratadas con QUIN. El selenio también atenuó significativamente la conducta de rotación, la disminución de GABA y la tasa de daño neuronal.

Estos resultados sugieren, en primera instancia, que la mayoría de los marcadores de neurotoxicidad inducidos por QUIN son mediados por la formación de radicales libres y el estrés oxidativo. Adicionalmente se demuestra que el selenio juega un papel protector parcial en eventos excitotóxicos, evidenciando su participación en mecanismos de atenuación contra el estrés oxidativo. La relevancia de estos hallazgos apoya la idea del empleo de antioxidantes en el tratamiento de padecimientos neurodegenerativos.

ANTECEDENTES

I

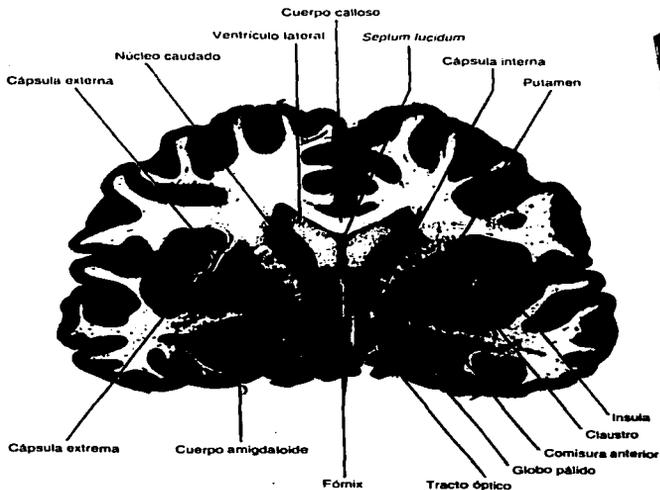
1. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD)

1. 1. ASPECTOS ANATÓMICOS DE HD

La HD esta clasificada anatómicamente como un padecimiento de los ganglios basales (ver cuerpo estriado en anexo), particularmente como una enfermedad propia de las *vías extrapiramidales*, debido a que involucra desde los ganglios basales (caudado, putamen y globo pálido) y hasta la corteza y los nervios periféricos, ocasionando desde movimientos involuntarios o "*corea*"; hasta deterioro cognitivo (Liles y Davies, 1969; Lange, 1976).

Las anomalías en el cerebro, de manera general, se caracterizan por destrucción de tejido del núcleo caudado y putamen, así como una atrofia cortical general simétrica (fig. 1) con alargamiento de los ventrículos laterales (Bruyn y cols., 1973; Hayden y cols., 1981; Von Sattel y cols., 1985). La atrofia cortical es generalmente más marcada en la región frontal, pero puede involucrar al cerebro entero en pacientes con enfermedad avanzada. Con la extensa degeneración del cerebro se presenta una marcada reducción del peso cerebral, en la cual puede ser reducido en 200 g o más (Robert y cols., 1998). Se observa además una extensa pérdida de células en el estriado, especialmente en neuronas pequeñas componentes del núcleo caudado y del putamen; sin embargo, más tarde, tanto las neuronas pequeñas como las largas degeneran (Forno y cols., 1973 y 1979). Se piensa que las neuronas espinosas de tamaño medio presentan mayores anomalías en HD, usualmente con anomalías dendríticas. En estados avanzados de la enfermedad, el globo pálido también muestra una baja neuronal y encogimiento, y la baja neuronal en todos los ganglios basales puede eventualmente ser casi completa. Se nota un incremento, de marcado a moderado, en glía en las áreas afectadas por la pérdida celular. La reacción glial primariamente es astrogial, pero hay un relativo incremento en

A



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

B



Fig. 1 Se muestra un corte coronal del cerebro anterior. A) Cerebro normal. B) Atrofia cortical, atrofia del núcleo caudado, y alargamiento de los ventrículos laterales, establecidos en un cerebro de un paciente con corea de Huntington (Kiernan J., 1998.;Clinical Neurology, 1995).

3A

las células oligodendrogliales. En la corteza cerebral, las células pequeñas de las capas más profundas predominantemente producen el choque del proceso degenerativo, y aquí se presenta la mayor gliosis, a comparación de otras áreas. Usualmente hay una disminución en la fibra mielinizada contenida en el estriado, pero pocas fibras desmielinizadas escapan a la destrucción (Robert y cols., 1998).

Otras áreas del cerebro que pueden mostrar pérdida neuronal incluyen núcleos ventrolaterales del tálamo, núcleos subtalámicos, hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal. Diferentes grados de pérdida neuronal son establecidos en estas áreas, junto con gliosis (Robert y cols., 1998).

1.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE HD

Las sustancias neurotransmisoras, desde el punto de vista de la función ganglionar basal, son el glutamato, el ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, acetilcolina y la serotonina. La sustancia P y la encefalina desempeñan funciones subsidiarias en las vías del GABA. El glutamato es, probablemente, el neurotransmisor más abundante en las proyecciones corticoestriatales excitatorias y en las neuronas excitatorias del núcleo subtalámico. El GABA es el neurotransmisor (inhibitorio) de las neuronas estriatales de proyección del globo pálido y de la parte reticulada de sustancia nigra. Las proyecciones nigroestriatales derivadas de neuronas de la parte compacta utilizan dopamina como su neurotransmisor (Kandel y cols., 1991).

Hablando específicamente de la HD, bioquímicamente se observa un deterioro en el metabolismo de la glucosa en núcleo caudado, con lo cual se postula una explicación parcial para los movimientos involuntarios provocados por L-dopa al inducir un exceso de dopamina (hasta un 70 % en putamen, caudado, globo pálido medio y lateral, núcleo acumbens, y sustancia nigra parte compacta) (Martin, 1984). El déficit neuroquímico incluye GABA, hasta un 60 %, en todas las áreas de los ganglios basales (incluyendo el núcleo caudado, putamen, globo pálido, y sustancia nigra), sustancia P, colecistoquinina y meta-encefalina (Beal y Mazurek, 1986), así como de otros neurotransmisores estriatonigrales (Spokes, 1981; Reynolds y Pearson, 1987). La sustancia P es ampliamente reducida en el globo pálido medio, así como la colecistoquinina en globo pálido y sustancia nigra, y la meta-encefalina en el globo pálido medio y lateral, y en ambas áreas de sustancia nigra (Martin, 1984). Entre los desórdenes en el metabolismo de otros

neurotransmisores se incluyen un incremento de norepinefrina en esta misma área, con una reducción de la glutamato descarboxilasa (GAD, la enzima de síntesis de GABA), y de acetilcolina y de su correspondiente enzima de síntesis, la colina-acetil transferasa (CAT), en cerebros con HD se observa una reducción del 50 % de su actividad por unidad de peso en el putamen y núcleo caudado. Esta última se ve reducida hasta un 50 % (Bird y cols., 1974; Mc Geer y cols., 1973). Enna (1985) demostró que los sitios enlazantes de GABA en neuronas estriatales no disminuyen más allá de lo esperado de acuerdo a la pérdida de células nerviosas, pero esto no ha sido suficiente para que el empleo de fármacos GABA-like contra la HD tengan éxito. En condiciones normales, los niveles de la enzima colina acetiltransferasa (CAT) son altos en los ganglios basales, particularmente en el putamen.

Volviendo a las características bioquímicas de HD, Los niveles de somatostatina y neuropéptido Y están incrementados más de 3 a 5 veces en caudado/putamen y globo pálido, sin cambios en otras áreas del cerebro (Aronin y col., 1983; Schwarcz y cols., 1983; Schwarcz y cols., 1984; Wolfensberger y cols., 1984; Kholer y cols., 1985). También hay una pérdida del 50 % de receptores muscarínico-colinérgicos en el estriado y globo pálido (Adams y cols., 1999).

Para revisión de los aspectos clínicos y antecedentes históricos del padecimiento ver anexo A y B.

1.3. MODELOS EXPERIMENTALES FARMACOLÓGICOS DE HD

Debido a que la HD reproduce dichas características bioquímicas específicas, se tiene un punto de partida hacia la investigación experimental del mismo. Partiendo de lo anterior, Schwarcz y colaboradores (1983) demostraron que el ácido quinolínic (QUIN) produce lesiones tipo *axon-sparing* (o de axón preservado) similares a las observadas en HD. Esas lesiones ocasionan una disminución de neurotransmisores en neuronas espinosas estriatales, entre los que se encuentra el GABA, pero sin afectar dopamina. Posteriormente se demostró que el estriado de pacientes con HD, a pesar de la disminución de GABA y la destrucción neuronal, registraba un moderado y paradójico incremento tanto de somatostatina como de neuropéptido Y, en principio atribuidos a una preservación selectiva ocasionada básicamente por una subclase de neuronas espinosas estriatales, a la cual estos péptidos se encuentran asociados (Aronin y cols., 1983; Beal y col., 1984;

Nemeroff y cols., 1983; Ferrante y cols., 1985; Dawbarn y cols., 1985). Sin embargo Beal y colaboradores (1986) publicaron un estudio que confirmó al QUIN como un excelente modelo de la HD, en donde resumimos lo siguiente:

Los siguientes resultados (análisis inmunohistoquímicos) fueron obtenidos de un estudio comparativo entre diferentes compuestos tóxicos (excitadores), e inductores de daño al sistema nervioso central de la rata, con el objeto de tratar de encontrar un modelo experimental farmacológico de la HD. Compuestos como el ácido kaínico (KA), el ácido iboténico (IA), el N-metil-D-aspartato (NMDA) y el ácido ftálico (PA), fueron todos comparados contra el ácido quinolínico (QUIN) (Shoulson, 1984).

En un primer experimento se le inyectó intraestriatalmente a las ratas el ácido quinolínico a diferentes concentraciones desde 75 hasta 450 nmoles/ μ l. El resultado fue una gráfica de respuesta dosis-dependiente en donde se aprecia el abatimiento tanto de GABA como de la inmunoreactividad a sustancia P-like, pero sin cambios en la somatostatina y el neuropéptido Y. De estos resultados, la dosis de QUIN que reprodujo el modelo de daño más confiable fue de 240 nmoles/ μ l (Shoulson, 1984).

En un segundo experimento se probaron los otros compuestos, pero incluyendo al QUIN, ya con la dosis óptima encontrada, y para los demás, en concentraciones previamente conocidas para la producción de daño neuronal. Los grupos recibieron ácido nicotínico (240 nmoles/ μ l), ácido ftálico (240 nmoles/ μ l), ácido quinolínico (240 nmoles/ μ l), NMDA (270 nmoles/ μ l), ácido iboténico (130 nmoles/ μ l) y ácido kaínico (10 nmoles/ μ l). Todas las inyecciones fueron intraestriatales. Todos estos fármacos demostraron tener un efecto neurotóxico, pero con diferencias específicas con respecto al QUIN. En la tabla 1 se resumen los hallazgos de diferentes reportes (Shoulson, 1984). El ácido nicotínico fue administrado como control debido a que estructuralmente es similar al QUIN, excepto por el grupo carboxilo en la posición 2 que posee el QUIN en el anillo piridínico. Ocho animales de cada grupo fueron sacrificados después de 3 semanas y analizados como en el primer experimento. La evaluación fue sobre cuerpo estriado (evaluando alteraciones morfológicas y perfiles bioquímicos), mostrando que, para el ácido ftálico y el ácido nicotínico, no hubo alteraciones significativas en la inmunoreactividad a la somatostatina-like (SLI), al neuropéptido Y-like (NPYLI), a la sustancia P-like, a la vasopresina-like (VLI). Sin embargo, el resto de los agentes empleados redujeron

sustancialmente la inmunoreactividad a la sustancia P, a la Ach y al GABA estriatal, tal como ocurre en la HD (Shoulson, 1984).

TABLA 1. PERFILES NEUROQUÍMICOS EN EL CUERPO ESTRIADO DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD) Y DE RATAS LESIONADAS CON ÁCIDO KAÍNICO E ÁCIDO IBOTÉNICO (KA/IA) Y ACIDO QUINOLINICO

| Molécula Neuroactiva | pacientes (HD) | ratas (KA/IA) | ratas (QUIN) |
|----------------------|----------------|---------------|--------------|
| GABA/GAD | ↓ | ↓ | ↓ |
| Acetilcolina/CAT | ↓ | ↓ | ↓ |
| Sustancia P | ↓ | ↓ | ↓ |
| Dopamina | ↔ | ↔ | ↔ |
| Vasopresina | ↔ | ↔ | ↔ |
| Somatostatina | ↑ | ↓ | ↔ |
| Neuropéptido Y | ↑ | ↓ | ↔ |

↓ = Disminuye, ↑ = Aumenta, ↔ = Sin cambio

Bruyn y Stoof, (1990): *The Quinolinic acid hypothesis in Huntington's Chorea*
 J. Neurol. Sci. 95: 29-38.

A diferencia de los otros agentes, el QUIN no alteró la inmunoreactividad de la somatostatina ni del neuropéptido Y, de modo muy semejante a lo que ocurre en la HD, estableciendo así una selectividad fundamental con respecto a los otros agentes excitadores (que sí los afectan), y proporcionando un patrón de toxicidad más específico y reproducible para modelar esta enfermedad en animales. La necrosis y la degeneración celular características de la HD también han sido reproducidas con precisión por el QUIN. De éste estudio (Beal y cols., 1986) se ha profundizado más sobre el QUIN, postulándolo como la excitotoxina capaz de reproducir más fielmente las características bioquímicas, histopatológicas y conductuales de la enfermedad (Schwarcz y cols., 1984; Sanberg y cols., 1989; Bruyn y Stoof, 1990; Hantraye y cols., 1990; Block y cols., 1993). Los efectos tóxicos selectivos conferidos al QUIN son debidos a las características que reproduce cuando se le inyecta *in vivo* al cuerpo estriado de rata y de primates no humanos. Dichos efectos son resumiendo: La disminución estriatal de GABA y Ach así como de la actividad de sus respectivas enzimas de síntesis GAD y CAT, las alteraciones en el movimiento de

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

los animales lesionados, y la destrucción selectiva de neuronas GABAérgicas y colinérgicas estriatales, dando en conjunto, un patrón de similitud notable respecto a las alteraciones presentadas en pacientes con HD (Bruyn y Stoof, 1990). Más recientemente, tanto el QUIN como la vía metabólica de la kinurenina, han sido implicados en la patogénesis de algunas otras enfermedades neurodegenerativas (Moroni y cols., 1986; Schwarcz y cols., 1988; Stone y Coonick, 1985), infecciosas e inflamatorias (Heyes y cols., 1990; Heyes y Lackner, 1990; Heyes y cols., 1992). Así mismo, Heyes y colaboradores (1989, 1991) han demostrado que las concentraciones de QUIN están incrementados notablemente en médula espinal de pacientes infectados con VIH. Debido a los grandes niveles que se observan en estos pacientes, se pone en evidencia una correlación entre el QUIN y los síntomas y signos patológicos del complejo SIDA-demencia, confiriéndole a esta neurotoxina también una importancia inmunológica (Stone, 1993).

A los primeros reportes de la presencia de QUIN en el cerebro (Lombardi y cols., 1983; Wolfensberger y cols., 1984) siguieron los desarrollados por una técnica más sensible (Moroni y cols., 1989). Un método espectrofotométrico de masas proporcionó valores arriba de 12 pmol/mg de proteína o 2.1 nmol/g de tejido de QUIN en cerebro de rata (Lombardi y cols., 1983a) y un 150% de incremento en esas concentraciones en respuesta a la carga de L-triptofano (Lombardi y cols., 1983b). Estos valores representan concentraciones totales de aproximadamente 2 μ M, con altos niveles registrados en neocorteza (2.1 nmol/g) y bajos niveles en estriado (0.6 nmol/g).

No existe una aparente correlación entre la distribución del QUIN y la 5-hidroxitriptamina (5-HT) en áreas del cerebro estudiado (Moroni y cols., 1984a), un descubrimiento que implica una separación de la compartimentalización de las vías metabólicas relevantes y que es soportado por el fracaso de la 5,7-dihidroxitriptamina, una toxina neuronal serotoninérgica que modifica niveles de QUIN.

El QUIN además mostró niveles normales en estudios cerebrales *postmortem* en pacientes con HD, niveles que resultan ser similares a aquellos registrados en ratas y otras especies (Wolfensberger y cols., 1984). Las concentraciones de QUIN no variaron grandemente entre las diferentes regiones cerebrales, todos por el rango de concentración de micromoles; se encuentra incluso, menos en la corteza cerebral, con aproximadamente 2 nmol/g de peso húmedo, y generalmente se encontraron niveles de 2 a 4 veces el doble de lo normal en el estriado (Moroni y cols., 1984a; Wolfensberger y cols., 1984).

La administración de triptofano a ratas puede incrementar el contenido cerebral de los dos metabolitos mencionados (5HT y el QUIN) de una manera dosis-dependiente: una inyección de 400 mg/kg de triptofano condujo a la elevación de 10 veces la concentración del QUIN en el cerebro (Russi y cols., 1991). Cambios comprobables fueron reportados por Heyes y Markey (1988), quienes inyectaron entre 77 y 208 mg/kg de triptofano.

2. ÁCIDO QUINOLÍNICO

2.1. QUIN Y REPRODUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD

2.1.1. GENERALIDADES DEL QUIN

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico (o QUIN) fue identificado por primera vez por Wolfensberger y colaboradores (1984) en tejido cerebral de rata y de humano, y posteriormente en cerebro de ratón, conejo, y otros mamíferos pequeños (Moroni y cols., 1984). En este primer informe (Wolfensberger y cols., 1984) se observó que el QUIN está presente preferencialmente en núcleo caudado, corteza cerebral y corteza frontal cerebral, concordando dichas regiones con lo encontrado en tejido cerebral de ratas. En un segundo informe (Moroni y cols., 1984), se establece que el QUIN está presente en corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral de varios mamíferos, y que su concentración aumenta directamente con la edad, de manera que en los animales "seniles" los niveles de dicha toxina son más altos. Dado que el QUIN puede estar involucrado en algunos de los procesos de envejecimiento celular relacionados con la edad, es probable que sea un factor potencialmente activo en la degeneración neuronal espontánea que ocurre durante los cambios fisiológicos vinculados con la edad. Este hecho es interesante cuando se considera que los efectos tóxicos inducido por este metabolito endógeno sólo se han observado en tejido nervioso maduro (Schwarcz y cols., 1984), lo que refuerza la tendencia a pensar en un posible vínculo entre las alteraciones celulares relacionadas a la edad y la sobreproducción de esta neurotoxina. El incremento observado en el QUIN se observó preferencialmente en cuerpo estriado y corteza cerebral (Moroni y cols., 1984), regiones especialmente susceptibles a la toxicidad de este

aminoácido excitotóxico (Beal y cols., 1986; Schwarcz y cols., 1984), a los procesos patológicos encontrados en la HD (Bugiani y cols., 1984; Martin y Gusella, 1986; Gravelord y cols., 1985), y a los procesos generales de envejecimiento (Cote, 1985), existiendo así múltiples puntos de concordancia.

2.1.2. QUIN Y SU ASOCIACIÓN A PATOLOGÍAS HUMANAS

La vía de la kinuremina y el QUIN, uno de sus productos, juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, y en particular del complejo SIDA/demencia. Debido a la gran cantidad de procesos oxidativos presentes en esta vía de oxidación, la generación de radicales libres durante dicho proceso es considerablemente elevada (Vender, 1975). Bajo condiciones normales, gran parte del triptofano catabolizado sigue la vía hasta formar Acetil-coA. Sólo una pequeña proporción del metabolismo diario del triptofano deriva a otros metabolitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas de constante disposición de triptofano, la excreción de kinuremina y de metabolitos intermediarios como el QUIN se incrementa considerablemente (Vender, 1975).

Se sabe que, en el estriado de rata, el ácido kinurénico bloquea los efectos neurotóxicos del QUIN en el cerebro (Foster y cols., 1984; Guillemín y cols., 2001). Al QUIN además se le ha asociado con cáncer (Harman, 1993) a través de la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Ganther, 1999; Platenik y col., 2001). Dado que se ha demostrado que el QUIN *per se* induce la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ *in vivo* en cuerpo estriado de rata (Santamaría y cols., 2001b).

El QUIN es sintetizado en microglia y macrófagos en el estriado de rata a través de la 3-hidroxiantranilato oxigenasa, determinada con alta capacidad y baja afinidad para 3-hidroxiantranilato; así, los niveles extracelulares de QUIN durante una inflamación neuronal son tan altos que promueven la excitotoxicidad (Lehrmann y cols., 2001; Obrenovitch, 2001). Los astrocitos presentan un papel protector al minimizar la producción de QUIN y maximizando la síntesis de ácido kinurénico; sin embargo, en presencia de macrófagos y/o microglia, los astrocitos se vuelven indirectamente neurotóxicos por la producción de grandes concentraciones de kinuremina que puede ser metabolizada secundariamente por monocitos infiltrados o cercanos, quienes formarán QUIN (Guillemín y cols., 2001).

2.1.3. QUIN Y DESTRUCCIÓN NEURONAL

El QUIN como excitotóxina, al ser infundido intraestriatalmente de manera crónica y a bajas concentraciones (4-10 nmol/h) induce una degeneración de células neuronales tiempo-dependiente, con una disminución selectiva de células colinérgicas (Forloni y cols., 1992). La degeneración se observa alrededor del sitio de inyección. Se ha observado un incremento en la actividad de las aferentes dopaminérgicas en las fases aguda y subaguda de la inyección de QUIN, detectándose además un incremento en los niveles locales de norepinefrina luego de 4 y 11 días de la inyección intraestriatal de QUIN, permaneciendo sin cambios en los sitios distantes o en los periodos más cercanos al momento de la microinyección (Mazzari y cols., 1986), así también hay un incremento en la actividad de la enzima QUIN-fosforibosiltransferasa (enzima que degrada al QUIN) en respuesta a los eventos neurodegenerativos (Foster y cols., 1985). Se observa además una reducción dosis-dependiente del contenido estriatal de GABA, luego de una infusión intraestriatal de QUIN (Harris y cols., 1998). La inyección de QUIN en cuerpo estriado no altera los sitios distantes a la inyección. Un incremento agudo en las concentraciones de QUIN conduce a un aumento en la actividad nigroestriatal mediada por estimulación excesiva de neuronas, mientras que cambios subsecuentes representan las reacciones locales de las terminales nerviosas dopaminérgicas secundarias a la degeneración neural en el estriado (Foster y cols., 1984).

2.1.4. QUIN Y RECEPTORES NMDA

Desde hace tiempo se ha establecido que la acción excitotóxica del QUIN en estriado está mediada por los receptores tipo NMDA, y su acción es antagonizada por magnesio y aminofosfonatos. La estimulación del receptor NMDA por QUIN en estriado de rata produce desórdenes metabólicos diversos: reducción del consumo de O_2 mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y NAD, así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon y cols., 1997). Además, reproduce el patrón de la pérdida de células neuronales característica de la HD (El-Defrawy y cols., 1986 ; Bordelon y cols., 1997). Hay también una reducción de la actividad de la glutatión reductasa, observada en

experimentos en ratas, que sugiere una causa o factor de contribución al déficit observado en la disponibilidad del glutatión inducida por QUIN (Aguado y cols., 2000).

2.1.5. QUIN Y LIPOPEROXIDACIÓN

Se ha visto que la peroxidación lipídica inducida por QUIN involucra una selectividad regional y puede ser prevenida parcialmente por antagonistas de receptores para NMDA (Rodríguez-Martínez y cols, 2000; Santamaría y cols., 2001a). Como ya se comentó, existen evidencias de que el QUIN *per se* induce la formación de radicales $\bullet\text{OH}$ *in vivo* en cuerpo estriado de rata durante los primeros estadios de toxicidad aguda (Santamaría y cols., 2001b); quizá por ello, algunas de las defensas antioxidantes endógenas se han visto modificadas por la administración de la toxina. Mientras que la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD) permanecen sin cambios por efecto del QUIN, la actividad de la SOD dependiente de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (Cu, Zn-SOD) disminuye significativamente, así como ocurre con el sistema antioxidante endógeno conformado por glutatión-reducido:glutatión-oxidado (GSH/GSSG). Se establece, de este modo, la capacidad del QUIN para inducir daño neuronal a través de la formación de radicales libres y el abatimiento de los sistemas antioxidantes endógenos más relevantes (Rodríguez y cols., 2000; Santamaría y cols., 2001a; Santamaría y cols., 2001b).

3. SELENIO

El selenio, descubierto en 1817 por Berzelius, es un elemento del grupo VI en la tabla periódica. Como calcógeno típico, comparte muchas propiedades con su vecino el azufre. Sus estados de oxidación -2, 0, +2, +4, y +6 (Tabla 1), implican que es propenso a liberar o aceptar pares electrónicos. No se conocen compuestos de selenio con electrones desapareados (como por ejemplo, radicales estables de selenio).

Tabla 1. Estados de oxidación del selenio

| <i>Estructura química</i> | <i>Estado de oxidación</i> | <i>Nombre del ácido</i> | <i>Nombre de la sal</i> |
|--|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| H ₂ Se | -II | Selenuro de hidrógeno | Selenuro |
| R-SeH | -II | Selenol | |
| Se | 0 | Ac. Selénico | |
| R-Se-OH | 0 | Ac. Selenínico | Selenato |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R-Se-OH} \end{array}$ | +II | Ac. Selenínico | Seleninato |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO-Se-OH} \end{array}$ | +IV | Ac. Selenioso | Selenito |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO-Se-OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | +VI | Ac. Selénico | Selenato |

(Brigelius-Flohe y cols, 2000).

El Selenio se considera un elemento traza esencial (Schwarz y Foltz, 1957), y un cofactor en procesos enzimáticos. Esto es apoyado por Rotruck y colaboradores (1972, 1973) cuando descubrieron que las células rojas de ratas deficientes en selenio mostraron sensibilidad al H₂O₂, asociando esto con la disminución en la actividad de la GPx. Más recientemente se ha observado que hay una disminución en la actividad de GPx en estriado y sustancia negra de animales en dietas deficientes de selenio (Castaño y cols.,

1993). Se ha establecido una relación estequiométrica de selenio en el contenido de GPx purificada (Flohé y cols., 1973; Sang-Oh y cols., 1974; Awasthi y cols., 1975) por la baja actividad debida a la eliminación de selenio, demostrando así su papel catalítico por mutagénesis sitio-dirigida (Rocher y cols., 1992).

Mientras que el elemento selenio como tal no está biodisponible del todo, algunos otros compuestos de selenio pueden ser absorbidos. Así, compuestos orgánicos como selenometionina y selenocisteína son absorbidos por mecanismos de transporte compartidos con aminoácidos sulfurados correspondientes. La absorción del selenito ocurre por difusión pasiva, mientras que el selenato es atrapado por un transportador acarreador mediado por sodio (Venderland y cols., 1994).

Los compuestos más comúnmente administrados a humanos y animales como suplemento de selenio son en forma de selenometionina, selenocisteína, y la sal inorgánica, selenito de sodio (Na_2SeO_3). El selenito es reducido a selenuro de hidrógeno (H_2Se) por una selenodiglutatión (GSSeSG), y a través de la reducción mediante tioredoxina reductasas dependientes de NADPH y tioles; el H_2Se también se obtiene por liberación de selenocisteína por la acción de liasas. Así, el selenio es reducido del estado de oxidación +4 al -2, consumiendo seis equivalentes reductores por mol de selenito. La rápida oxidación del selenuro de hidrógeno por oxígeno conduce más adelante a un consumo de NADPH por tioredoxina reductasa o glutatión reductasa para mantener las concentraciones de H_2Se . La asimilación de selenato parece depender de la reducción bacteriana a selenito para poder ser utilizado por el organismo mamífero. La selenometionina es el metabolito clave del metabolismo del selenio. Esta es la forma empleada para biosíntesis de selenoproteínas. El primer paso es la formación de selenofosfato de H_2Se y ATP por la selenofosfato sintetasa (Veres y cols., 1994). El selenofosfato se requiere para la síntesis de selenocisteína de serina enlazada a un Trna específico, por medio de la selenocisteinsintasa. El Trna cargado con selenocisteína resultante, provee la selenocisteína para la incorporación de las cadenas peptídicas en crecimiento a los ribosomas (Seko y cols., 1989; Seko y cols., 1997; Hsieh y Ganther, 1977; Björnstedt y cols. 1996; Ganther, 1999).

En la biosíntesis de las selenoproteínas, el selenio es canalizado a algunas las selenoproteínas en forma preferencial; como consecuencia, algunas selenoproteínas responden rápidamente a la deficiencia de selenio con una baja en su actividad, otras

permanecen estables en deficiencias moderadas y disminuyen únicamente después de una baja substancial y prolongada de este elemento. La pérdida de actividad de selenoproteínas en la restricción de selenio usualmente es acompañada por una baja retardada de Mrna. El interés del selenio durante la biosíntesis de selenoproteínas es básicamente regulado por tres factores: la disponibilidad de Trna^{(ser)sec} cargado con selenocisteil, la eficiencia de la estructura secundaria característica en el Mrna (SECIS), y la posibilidad relacionada a la estabilidad del Mrna. Sin embargo éste está abierto a la modulación por regulación transcripcional por estímulo externo, hormonas, factores de transcripción tejido-específicos o empleo preferencial del selenio por tejidos particulares (Brigelius y Flohé, 1999; Flohé y cols., 1997).

In vivo, el selenito es el precursor más efectivo para la actividad de cGPx (Néve, 1995). Se ha demostrado en cultivos celulares, que el selenito fue el precursor más efectivo para la expresión de la GPx. En algunas líneas celulares, la selenometionina, a pesar de incrementar el contenido de selenio celular, no incrementa la actividad de Gpx (Beilstein y Whanger, 1987; Leist y cols., 1999). En humanos, una dosis diaria de 1 µg de selenio biodisponible por kilogramo de peso corporal es sugerido como suficiente para cuidar la actividad óptima de GPx (Levander, 1991). Sin embargo, el rango establecido por la Food & Nutrition Board como ingesta diaria segura y adecuada en los Estados Unidos es de 50-200 µg/día.

El selenio, si es administrado en exceso, es metabolizado a dimetilselenuro, un agente neurotóxico, y puede inducir daño tisular oxidativo por autooxidación en el ciclo redox, así como otros disturbios metabólicos. Como constituyente de selenoperoxidasas, el selenio reduce H₂O₂ y otros hidropéroxidos, previniendo así la iniciación y/o propagación de cadenas de radicales libres dependientes de peróxido (Brigelius-Flohe y cols., 2000).

Los efectos biológicos de los compuestos de selenio dependen de su naturaleza química y destino metabólico. Así, se postula al selenito como factor preventivo de apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno *in vitro*, aunque la mayoría de los estudios enfocan a la GPx y la tioredoxina reductasa con esta propiedad. Sin embargo, Sang-Oh y colaboradores (2001) postulan que el selenito interrumpe la apoptosis inducida por H₂O₂ bloqueando a la molécula apoptótica ASK1 y estimulando la actividad del complejo antiapoptótico PI3-cinasa/Akt, además de bloquear la actividad de las caspasas -3 y -9. Sus observaciones demuestran que el selenito incrementa la proliferación celular y

mantiene la supervivencia celular por activación de señales antiapoptóticas y bloqueando la señal apoptótica.

Respecto a la enzima tioredoxina reductasa, se sabe que contiene un residuo selenocisteil, el cual es esencial para la catálisis de esta enzima. Su mecanismo de acción involucra la transferencia del equivalente reducido NADPH por la coenzima FAD a un puente disulfuro cerca de la región amino terminal, y de este al sustrato disulfuro tioredoxina. Las tioredoxinas actúan como sustratos reductores para una variedad de enzimas como ribonucleótido reductasa, metioninsulfoxidoreductasa, 3'-fosfoadenosin5'-fosfosulfatoredoxina y peroxidasas tipo peroxiredoxina. Ellas regulan al parecer el estado redox de proteínas redox-sensibles y participan en la activación de factores de transcripción, en particular del NF- κ B. En contraste, la exposición a selenito en concentraciones micromolares pueden revocar la activación transcripcional de NF- κ B por interacción directa con los grupos -SH vecinos de la tioredoxina, lo cual es necesario para la reducción nuclear del factor de transcripción. Algunas proteínas antioxidantes han sido renombradas como peroxiredoxinas; así, identificadas entonces como tioredoxina peroxidasas, puede competir con Gpx o catalasa por el sustrato hidropéroxido en común (Cardenas y col.,2002).

En músculo se encuentra la selenoproteína W; sin embargo, su Mrna también ha sido detectado en bazo, testículos, y cerebro (Yeh y cols., 1997). En cuanto a su función específica enzimática, aún es desconocida al igual que su función biológica.

La selenoproteína P es inusual en cuanto a su contenido de 9 selenocisteinas en el humano y 12 en bovino. Es expresada con una secuencia guía dirigiendo la proteína al espacio extracelular. Parece estar primariamente en hígado, pero su Mrna se ha encontrado casi en todas partes. Esta selenoproteína ha sido caracterizada por uno o dos *clusters* (racimos) ricos en histidina y algunos sitios de glicosilación. Sus múltiples residuos selenocisteinil sugieren una capacidad de catálisis con función redox; sin embargo, su actividad enzimática aún no ha sido bien identificada. Se ha reportado que puede actuar como GPx extracelular: remueve peroxinitrito *in vitro*, pero la regeneración de su forma reducida tampoco ha sido aclarada. Se especula que su papel es transportar y almacenar al selenio, prevenir la toxicidad del selenio y apoyar las defensas antioxidantes (Cardenas y col.,2002).

Reportes experimentales sugieren que hay un incremento dosis-dependiente en el contenido de lípidos totales (entre 0.1 y 0.2 mg/Kg) producido por selenito de sodio en estriado y tálamo de animales. Los resultados observados en el trabajo de Zia e Islam (2000) indican que, por el incremento del contenido de lípidos totales, el selenio podría incrementar los lípidos en la vaina de mielina, la cual es responsable de una transmisión nerviosa más rápida entre las neuronas.

En resumen, el selenio (Se) es un componente esencial en la dieta y se ha encontrado en una gran cantidad de proteínas. La mayoría de éstas son oxidoreductasas, mientras que cuatro son peroxidasas. La relevancia de este elemento traza como defensa antioxidante biológica en mamíferos ha sido ampliamente aceptada. Desde luego, este efecto se consigue a concentraciones bajas en los mamíferos. El Se actúa como centro catalítico de la GPx (Brigelius-Flohé, 1999; Flohé y cols., 1997). El selenio ejerce así una defensa contra los radicales libres, evitando el estrés oxidativo: a través de la GPx actúa removiendo hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados. El selenio, por tanto, juega un papel importante en la protección de lípidos de membrana y consistentemente, se ha demostrado que el abatimiento de la GPx en estriado de animales obedece a deficiencias de selenio, conduciendo a la degeneración de neuronas dopaminérgicas y a la apoptosis (Savaskan y cols., 2002).

Todos estos antecedentes sugieren que el empleo de selenio para el tratamiento de los eventos tóxicos que pueden generarse a partir de procesos excitotóxicos constituye un reto farmacológico interesante y que su abordaje en el modelo experimental de la HD producido por el QUIN puede proveer información importante sobre los mecanismos de daño neuronal involucrados en esta neuropatía y sobre el diseño y orientación de sus posibles alternativas terapéuticas.

❧ HIPÓTESIS ❧

II

Dado que el ácido quinolínico se emplea para la inducción de un modelo experimental de la enfermedad de Huntington, (reproduciendo sus parámetros bioquímicos, histopatológicos y conductuales en ratas), además de ser un bien documentado metabolito endógeno del triptofano y potente agente prooxidante, nosotros proponemos que el pretratamiento subcrónico con selenio como selenito de sodio (un conocido agente antioxidante y promotor de la actividad de la GPx), atenuará la neurotoxicidad estriatal producida por el ácido quinolínico a través de mecanismos antioxidantes, reduciendo la actividad de las especies reactivas de oxígeno y del consecuente estrés oxidativo, que eventualmente conduce a una degeneración neuronal y muerte celular.

OBJETIVOS

III

GENERAL

- Caracterizar los efectos de la administración subcrónica de selenito de sodio como pretratamiento sobre diferentes marcadores de neurotoxicidad y daño oxidativo evocados por la administración intraestriatal de QUIN a ratas, en un modelo experimental de la HD.

PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del pretratamiento con selenito de sodio sobre la peroxidación lipídica producida por el QUIN en el cuerpo estriado de rata.
2. Evaluar el efecto del pretratamiento con selenito de sodio sobre la actividad estriatal de la GPx en animales lesionados intraestriatalmente con QUIN.
3. Evaluar el efecto del pretratamiento con selenito de sodio sobre el patrón conductual de rotación producido por la administración intraestriatal de QUIN a ratas.
4. Evaluar el efecto del pretratamiento con selenito de sodio sobre los niveles estriatales de ácido γ -aminobutírico (GABA) en animales lesionados intraestriatalmente con QUIN.
5. Evaluar el efecto del pretratamiento con selenito de sodio sobre las alteraciones morfológicas producidas por el QUIN en el cuerpo estriado de rata.

❧ MATERIALES Y MÉTODOS ❧

IV

4.1. REACTIVOS Y ANIMALES

Se usó agua desionizada para la preparación de todos los reactivos y soluciones. El QUIN, el selenito de sodio (Na_2SeO_3), la apomorfina (APO), la albúmina bovina, el HEPES, el o-phtaldehído (OPA), el 2-mercaptoetanol, el ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) y un kit de estándares de L-aminoácidos para cromatografía de líquidos, se obtuvieron todos de Sigma Chemical Co., El resto de los reactivos fueron obtenidos de E. Merck y J.T. Baker.

Se emplearon ratas Wistar machos (250-300 g), las cuales fueron obtenidas del Bioterio del I.N.N.N. Los animales fueron almacenados en cajas de acrílico (5 por caja), con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, y bajo condiciones constantes de luz (ciclos de 12:12 hrs. de luz:oscuridad), temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) y humedad.

4.2. TÉCNICAS

4.2.1. PRETRATAMIENTO DE LOS ANIMALES CON SELENIO E INYECCIÓN INTRAESTRIATAL CON QUIN

Todos los experimentos se realizaron en el Lab. de Aminoácidos Excitadores del I.N.N.N. Se diseñaron 4 grupos experimentales: 1) solución salina (S.S.) intraperitoneal (i.p.) + S.S. intraestriatal (i.e.); 2) Na_2SeO_3 (i.p.) + S.S. (i.e.); 3) S.S. (i.p.) + QUIN (i.e.); 4) Na_2SeO_3 (i.p.) + QUIN (i.e.). La solución administrada por vía intraperitoneal, según el grupo, fue inyectada durante cinco días, una vez al día, sin interrupción. La concentración de selenito de sodio administrada fue de 0.625 mg/kg de peso del animal. Al quinto día de administración, y 120 minutos después de la última inyección i.p., las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0.2 ml/250 g de peso) e inyectadas unilateral y estereotáxicamente con coordenadas de acuerdo al Atlas esterotáxico de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1894) en el estriado derecho (caudado/putamen) con S.S. (pH 7.4) ó QUIN (240 nmol/ μl , pH 7.4), según el grupo de tratamiento. La inyección en estriado se realizó en un lapso de 2 min. y se mantuvo la aguja en la zona de lesión por 2 min. más para permitir la adecuada difusión de la solución inyectada.

En el siguiente diagrama de flujo, se resumen los procedimientos experimentales abordados en este estudio:

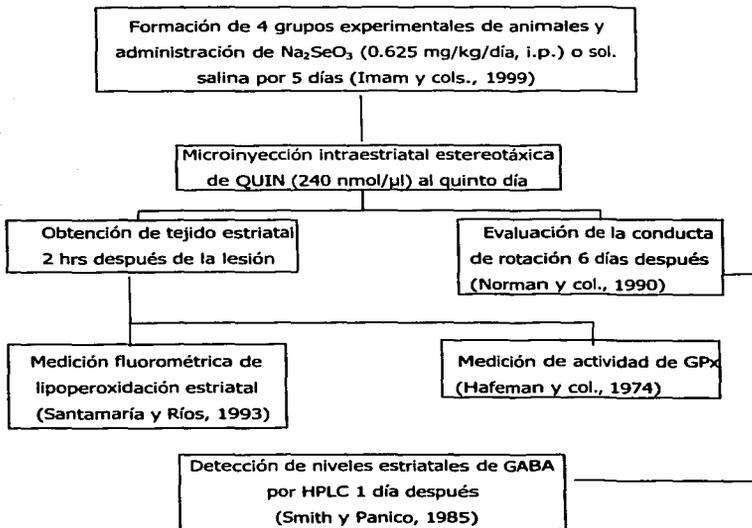


Diagrama de flujo del diseño experimental

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.2.2. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Se desarrolló por método fluorométrico de detección de productos de la peroxidación modificado por Santamaría y Ríos (1995) a partir de un reporte original de Triggs y Willmore (1984). Dos horas después de la inyección estriatal de QUIN a las ratas, se midieron los productos fluorescentes derivados de la peroxidación, según los siguientes pasos:

- A) El tejido estriatal extraído es pesado y homogenizado en 3 ml de solución salina (0.9 % NaCl).
- B) A 1.0 ml del homogenado se adicionan 4.0 ml de una mezcla cloroformo:metanol (relación 2:1, v:v), y se mezclan por 60 segundos.
- C) Se dejan reposar los tubos en hielo durante 45 min protegidos de la luz y la fase lipídica (correspondiente a la fracción clorofórmica) es separada por extracción de la fase metanólica, la cual es desechada.
- D) Se procede a la medición de la señal de fluorescencia en cada muestra en un espectrofotómetro de luminescencia Perkin-Elmer LS50B, a longitudes de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 430 nm, con un slit o ancho de banda de 15 nm (la sensibilidad de espectrómetro fue ajustada previamente con un estándar fluorescente de quinina (0.1 µg/ml) en ácido sulfúrico 0.05 M, a 300 unidades).
- E) Los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido fresco.

4.2.3. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA

La técnica original empleada para medir la actividad de GPx fue descrita por Mills (1959) y modificada por Hafeman (1973), y está basada en la oxidación no enzimática de glutatión reducido (GSH). El ensayo fue realizado 2 horas después de la inyección intraestriatal de QUIN bajo las siguientes condiciones:

- A) Curva estándar: Se parte de un stock de GSH a una concentración de 1 mg GSH / ml H₂O desionizada. Entonces, se construye la siguiente curva:

| concentración 10 ⁻² (mM) | GSH (µl) | Amortigua- dor | DTNB (ml) |
|--|-------------|-------------------|--------------|
|--|-------------|-------------------|--------------|

| | | (ml) | |
|--------|-----|-------|-----|
| 0.0 | 0.0 | 4.5 | 0.5 |
| 0.1625 | 2.5 | 4.497 | 0.5 |
| 1.625 | 25 | 4.475 | 0.5 |
| 16.25 | 250 | 4.250 | 0.5 |

- B)** En un tubo de ensayo, por cada muestra de tejido estriatal homogenado se adicionan 1.0 ml de glutatión reducido 2mM + 1.0 ml de buffer de fosfato dibásico 0.4 M (pH 7.0) con EDTA en una concentración 0.4 mM + 0.5 mL de azida de sodio (NaN₃) 0.01M + 30 µl del homogenado de cada muestra + 1.47 ml de agua desionizada para completar un volumen de 2.0 ml.
- C)** Se incuban los tubos durante 5 minutos a 37°C.
- D)** Se adiciona a cada tubo 1.0 ml de peróxido de hidrógeno 1.25 mM preincubado a 37°C.
- E)** Se incuban los mismos tubos 3 minutos más a la misma temperatura.
- F)** Se toma una alícuota de 0.5 ml de cada tubo.
- G)** Se adicionan 2.0 ml de una solución de 1.67 g de ácido metafosfórico glacial + 0.2 g de EDTA + 30 g de cloruro de sodio en un volumen final de 100 ml con agua desionizada.
- H)** Se agitan los tubos y se centrifugan durante 15 minutos a 3,500 r.p.m.
- I)** Se toman 2.0 ml del sobrenadante de cada centrifugado.
- J)** Se adicionan 2.0 ml de buffer de fosfato dibásico 0.4 M + 1.0 ml de ácido 5',5'-ditio-bis(2-nitrobenzónico) (DTNB, 20 mg en 50 ml de solución al 1.0 % de citrato de sodio), protegiéndose los tubos de la luz.
- K)** Dos minutos después, se lee la densidad óptica a 412 nm en un espectrofotómetro U.V./Vis Genesis 8 TermoSepctronic.
- L)** Las unidades de actividad enzimática se obtienen con la siguiente fórmula : $A=10(\log Co - \log Cm)$. Donde log=logaritmo base 10; Co=concentración inicial; Cm=concentración de muestra. Y para expresarla por hora, se multiplicó por 12 y se reportó por mg de proteína de cada muestra.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación del contenido de proteína en las diferentes muestras, se empleó una técnica espectrofotométrica ampliamente reportada (Lowry y cols., 1951). Esta

medición fué complementaria para la expresión de resultados de la actividad de GPx, y consiste en los siguientes pasos:

A) Curva estándar :

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | Albúmina (μl) | Agua (μl) |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 0 | 0.0 | 400 |
| 25 | 100 | 300 |
| 50 | 200 | 200 |
| 100 | 400 | 0.0 |

La curva estándar fue tratada igual que las muestras.

B) Dilución de la muestra:

50 μl de muestra

950 μl de agua

C) Se tomaron 400 μl del paso anterior.

D) Se adicionaron 2.0 ml de la mezcla de carbonato de sodio (2%) + Sulfato de cobre (1%) + tartrato de sodio y potasio (2%) y se agitaron los tubos vigorosamente.

E) Se dejaron reposar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

F) Se agregaron 200 μl de reactivo de Folín-Fenol (1:1, vol:vol) y se agitaron los tubos.

G) Se dejaron reposar los tubos durante 30 min. a temperatura ambiente.

H) Transcurridos los 30 min., se leyó la densidad óptica 550 nm en un espectrofotómetro U.V./Vis Genesis 8 TermoSepctronic.

I) Los resultados fueron obtenidos en mg prot/ml de muestra.

4.2.4. CONDUCTA DE ROTACION

A) En lotes independientes de animales tratados sometidos a los mismos tratamientos, al sexto día de la administración i.e. de QUIN, los animales fueron administrados con APO (1.0 mg/kg, s.c.) y se procedió a la evaluación conductual (Schwarcz y cols., 1979; Norman y cols., 1990).

B) Cada animal fue separado y mantenido en forma individual en cajas de acrílico para su observación.

C) Cinco minutos después, se registró el número total de giros ipsilaterales de c/animal durante 60 min. Cada rotación fue definida como un giro completo de 360° sobre sus

patas traseras. La APO, como agonista dopaminérgico, produce una conducta de rotación característica de lesiones estriatales unilaterales; en este caso, los giros fueron ipsilaterales al lado lesionado, como otros ya han reportado (Susel y cols., 1989; Santamaría y Ríos, 1993; Santamaría y cols., 1996; Santamaría y cols., 1997a).

D) Los resultados finales fueron expresados como No. de giros ipsilaterales/hr.

4.2.5. CONTENIDO ESTRIATAL DE GABA

La estimación del contenido estriatal de GABA se desarrolló en los diferentes grupos experimentales, de acuerdo al método reportado por Santamaría y colaboradores (1996 y 1997a)

A) Siete días después de la administración i.e. del QUIN, todos los animales fueron inyectados con un inhibidor de la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), el 3-MPA (1.2 mmol/kg, i.v.). Esto se realizó con la finalidad de prevenir un incremento de GABA en tejo muerto (van der Heyden y Korf, 1978).

B) Dos minutos después, se sacrificaron las ratas y se extrajo el estriado derecho.

C) Se homogeneizó el tejido en 15 volúmenes de metanol:agua (85 %, v:v).

D) Las muestras fueron centrifugadas durante 15 min. a 3,000 (g).

E) El sobrenadante se almacenó a -40°C hasta el análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se realizó por HPLC con detección fluorométrica por una reacción de derivatización (Fleury y Ashley, 1983; Smith y Panico, 1985). Se empleó un programa de gradiente lineal de 10 a 65 % de metanol bajo las siguientes condiciones:

A) A 100 µl de sobrenadante del paso E, se adicionaron 100 µl de OPA (5 mg de OPA + 625 µl de metanol + 5.6 ml de buffer de boratos 0.4 M (pH 9.5) + 25 µl 2-mercaptoetanol) y se agitaron los tubos por 1 min.

B) Se inyectaron 20 µl de la mezcla anterior en un cromatógrafo de líquidos BAS CC-5, el cual contenía una columna de fase reversa OPA-HS Alltech. La mezcla de gradiente consistió de solución buffer de acetato sódico 50 mM (pH 5.9) + 1.5 % v:v de tetrahidrofurano y metanol grado HPLC. Se empleó un detector de fluorescencia BAS FL-45A.

C) Los resultados finales se expresaron como µg GABA/g de tejido fresco.

4.2.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

- A)** En grupos independientes tratados bajo los mismos esquemas, siete días después de la inyección intraestriatal de QUIN, las ratas fueron anestesiadas con cloroformo por inhalación, y perfundidas transcardialmente (con una administración directa intracardial de heparina de 0.2ml en suero fisiológico (NaCl 0.9 %) seguido por una solución al 10 % de formaldehído también en suero.
- B)** Posteriormente, se extrajo el cerebro completo y se mantuvo en formol al 10 % para la fijación del tejido hasta su inclusión en parafina.
- C)** Para realizar la inclusión en parafina, el tejido fue deshidratado gradualmente, sumergiéndolo en cada etapa durante una hora, iniciando con un lavado en agua que continuó con la deshidratación progresiva en alcoholes al 60 %, 70 %, 80 % y alcohol absoluto. Se pasaron las muestras a xilol al 50 % y se continuó con xilol sin diluir, finalmente sumergiéndose en parafina líquida. Todas las etapas se realizaron por duplicado.
- D)** Los cerebros completos ya incluidos en parafina, se seccionaron en un microtomo en secciones de 5 μm de espesor, cada 100 μm de tejido, cubriendo una distancia total de 3 mm (1.5 mm anterior y 1.5 mm posterior a la zona de la microinyección). Una vez que se tiene la rebanada, se pasa a un baño de flotación (agua con grenetina) a una temperatura de 40-45°C con el objeto de que los cortes que están plegados se estiren y se logre su adhesión en el portaobjetos .
- E)** Se deja secar cada placa.
- F)** Para desparafinar los tejidos, primero son sumergidos en xilol durante 30 min. y 3 min. más en alcohol absoluto. Se inicia entonces el proceso de deshidratación:
- alcohol absoluto----- 3 min.
 - alcohol al 96%----- 3 min.
 - alcohol al 70%----- 3 min.
- G)** Se sumergen las placas en agua destilada durante 5 min para enjuagar. Posteriormente, se pasan por hematoxilina de Harris (10-15 min.), se lavan en agua corriente y luego en agua destilada. Se procede a pasar las placas por una solución saturada de carbonato de litio (para cambio de color del colorante, se lavan en agua

destilada, se sumergen en eosina por 2 min., se lavan de nuevo en agua corriente, y se procede a una nueva deshidratación:

Pasar por alcohol al 70%, agitar suavemente

Pasar por alcohol grado 96

Pasar por alcohol absoluto

Aclarar con xilol, dos cambios de 3 min c/u

Finalmente, se fijan con resina o bálsamo. Nota: pasar se refiere solo a meter y sacar el portaobjetos.

H) El conteo celular para determinar la tasa de daño neuronal se desarrolló de acuerdo a un reporte previo (Rodríguez y col., 1999). El número de neuronas -ya fueran preservadas, dañadas o totales- se obtuvieron con un promedio de 10 campos al azar seleccionados de tres secciones por cerebro de rata. El criterio general seguido durante el conteo de neuronas dañadas incluyó núcleos picnóticos, vacuolación citoplásmica y atrofia neuronal. La tasa de daño neuronal por campo fue calculada considerando el número de células dañadas vs el número total de células, y multiplicado todo por 100.

RESULTADOS

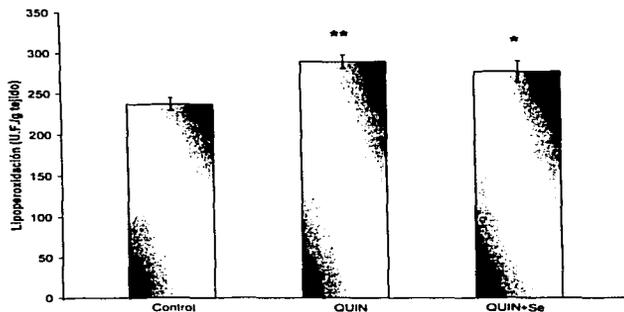
V

5.1. PEROXIDACIÓN ESTRIATAL DE LÍPIDOS

Se presentan resultados de la lipoperoxidación estriatal de animales tratados con QUIN y selenio; n entre 5 y 6 ratas.

Los productos de peroxidación lipídica en estriado que se muestran en la gráfica 1 se observa un incremento de 52% de lipoperoxidación inducida por QUIN con respecto al control, mientras que el efecto del selenio disminuye la peroxidación del QUIN en un 23%. El dato del tratamiento sólo con selenio no se muestra, pero éste no resultó distinto del tratamiento control. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA simple, seguido por una prueba de Tukey. Valores de $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ fueron aceptados como diferencias significativas vs el control.

Gráfica 1. Efecto del Se sobre la lipoperoxidación del QUIN



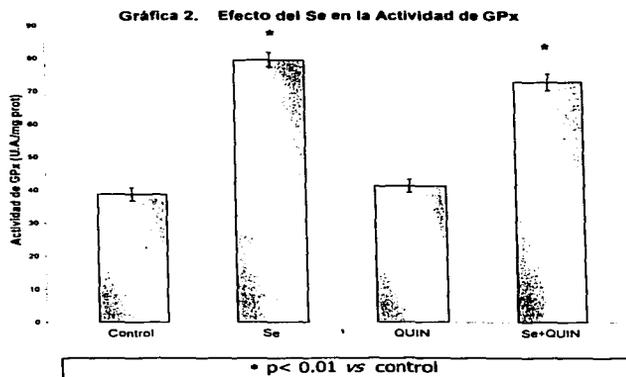
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control

TESTS CON
VALIA DE ORIGEN

5.2. ACTIVIDAD ESTRIATAL DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA

Se presentan datos de los niveles estriatales de actividad de la GPx en animales tratados con QUIN y selenio; n entre 8 y 9 ratas.

Como se muestra en la gráfica 2, el selenio, induce un aumento de 105% en la actividad enzimática de GPx respecto al control, mientras que el QUIN no muestra ninguna variación con respecto a la actividad basal. Sin embargo, el grupo de Se más QUIN muestra un aumento significativo (88%) con respecto al control. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA simple y prueba de Dunnett. Valores de $*p < 0.01$ se consideraron como diferencias significativas vs el control.



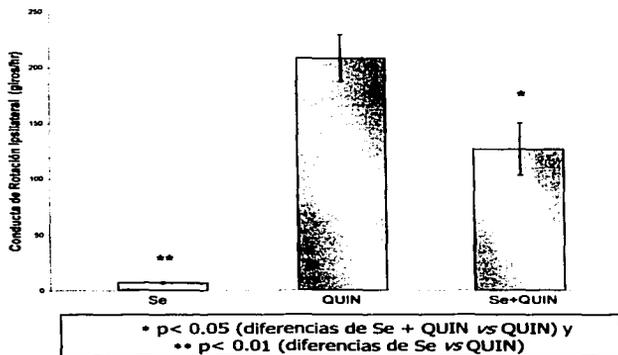
FALLA DE ORIGEN
TRISTE CON

5.3. EFECTO DEL SELENIO SOBRE LA CONDUCTA DE ROTACIÓN INDUCIDA POR QUIN

Se presentan los resultados de la conducta de rotación en animales tratados con QUIN y selenio; n entre 5 y 7 ratas.

El efecto del selenio en la conducta de rotación ipsilateral inducida por QUIN se muestra en la gráfica 3. Los animales control mostraron irritabilidad y excitación después de la inyección de APO, como ha sido reportado por Norman y colaboradores (1990) y por Santamaría y colaboradores (1996), pero no mostraron conducta de rotación alguna. Los animales lesionados con QUIN presentaron un marcado número de giros después de la inyección de APO, mientras que los animales tratados con selenio + QUIN atenuaron significativamente la conducta de rotación inducida por la administración de APO. Se aplicó un ANOVA de Kruskal-Willis seguido por U de Mann-Whitney. Valores de * $p < 0.05$ (diferencias de Se + QUIN vs QUIN) y ** $p < 0.01$ (diferencias de Se vs QUIN) fueron reconocidos como estadísticamente significativos.

Gráfica 3. Efecto del Se frente a la CR inducida por QUIN



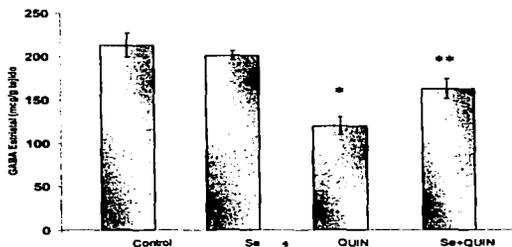
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4. EFECTO DEL SELENIO EN LOS NIVELES ESTRIATALES DE GABA

Se presentan datos de los niveles estriatales de GABA en animales tratados con QUIN y selenio; n entre 5 y 7 ratas.

Los cambios inducidos por QUIN en el contenido estriatal de GABA se muestran en la gráfica 4. El QUIN produjo una disminución significativa de -44% vs el control en los niveles de GABA, mientras que el Se atenuó el efecto del QUIN incrementando su valor en un 35%, comparado con los valores de QUIN sólo. Respecto al tratamiento de selenio sólo, no se aprecia diferencia alguna comparándolo con los niveles basales de GABA. El análisis estadístico realizado fue ANOVA simple seguido por la prueba de Dunnett. Se observó una diferencia a * $p < 0.05$ del QUIN vs el control, y a ** $p < 0.01$ del QUIN + Se vs el control.

Gráfica 4. Efecto del Se en los Niveles de GABA abatidos por QUIN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

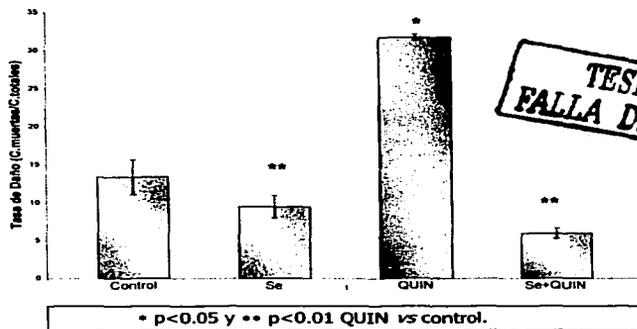
* $p < 0.05$ QUIN vs control, ** $p < 0.01$ QUIN + Se vs control

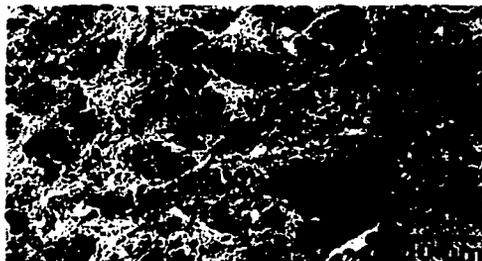
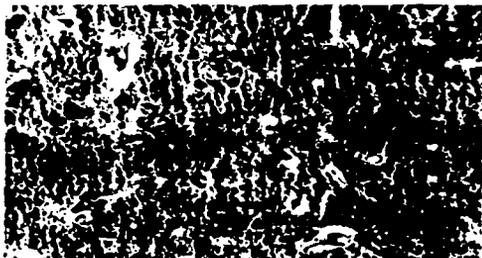
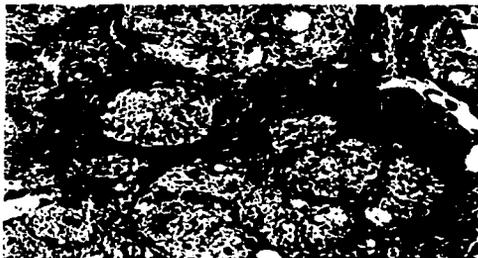
5.5. EFECTO DEL SELENIO SOBRE LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS POR QUIN

Se presentan resultados de la tasa de daño neuronal estriatal en ratas tratadas con QUIN y selenio; $n = 3$.

El efecto del selenio en las alteraciones morfológicas producidas por el QUIN en tejido estriatal se muestran en la micrografía 1. El tejido estriatal con QUIN mostró una marcada pérdida celular y atrofia comparada con los controles. El tejido de los animales administrados sólo con selenio no muestra efecto alguno comparando con el control. Por su parte, el tejido de los animales tratados con QUIN + selenio presentó una atrofia moderada y pérdida celular menos severa que en animales tratados sólo con QUIN, observándose un mayor número de cuerpos celulares preservados. El efecto del Se sobre la tasa de daño neuronal evocada por QUIN se muestra en la gráfica 5. El incremento del daño por QUIN resultó significativamente alto (438%) vs los valores control, mientras que los tratamientos con selenio en animales lesionados con QUIN disminuyeron significativamente el daño celular. El análisis estadístico empleado un ANOVA simple seguido por la prueba de Tukey. Valores de $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ fueron reconocidos para detectar diferencias de QUIN vs control.

Gráfica 5. Efecto del Se frente a la Tasa de daño Neuronal inducido por QUIN





Micrografía de cortes estriatales teñidos con Hematodina-Heosina. A) animales control, B) animales con Se + Quin, muestran daño del neuropilo, cuerpos celulares picnóticos ; C) animales tratados con Se + SSI; D) animales tratados con Se + QUIN, donde se observe que el neuropilo y los cuerpos celulares se conservan.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

VI

El Se es un componente esencial de la dieta, encontrándosele como centro catalítico de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), una enzima que disminuye el daño provocado por los radicales libres, reduciendo el H_2O_2 a agua e hidroperóxidos orgánicos a alcoholes (Harman, 1993). El sistema de glutatión reductasa/GPx representa uno de los mejores sistemas de defensa contra el estrés oxidativo en el cerebro (Rotruck y col., 1973).

En enfermedades neurodegenerativas con componentes oxidativos, como la enfermedad de Parkinson, se han detectado disminuciones considerables en la actividad de GPx (Hirsch, 1992), mientras que, por otra parte, se ha reportado que la deficiencia del Se provoca el incremento de la susceptibilidad del cerebro al daño oxidativo, afectando a monoaminas de substancia nigra y cuerpo estriado (Castaño y col., 1993).

En resumen, las propiedades terapéuticas del Se y de otros agentes antioxidantes han sido probadas en algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas a daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1984; Westermarck y Santavouri, 1984), así como en otros procesos patológicos como el cáncer (Harman, 1993). En este último se encontró que la incidencia de diferentes formas de cáncer es baja en áreas en donde el Se se encuentra en altas concentraciones, por lo que se ha propuesto que, en este caso existe una correlación inversa entre la incidencia de cáncer y los niveles de Se en suero, y este efecto es mediado presumiblemente por la reducción en reacciones de radicales libres (Ganther, 1999). Se ha demostrado además que el Se protege contra la neurotoxicidad inducida por metanfetamina a través de mecanismos de protección contra radicales libres en ratones (Imam y col., 1999).

En el presente trabajo, demostramos que la neurotoxicidad inducida por el QUIN se atenúa de manera sustancial por el Se en condiciones *in vivo*, sugiriendo que una fracción importante de la neurotoxicidad inducida por el QUIN es mediada por la formación de radicales libres y el estrés oxidativo. La toxicidad estriatal inducida por el QUIN se redujo

significativamente, como se aprecia en los resultados presentados tanto en peroxidación lipídica estriatal, como en el contenido estriatal de GABA, la conducta rotacional y la tasa de daño neuronal.

Por su parte, la administración del Se también incrementó la actividad de la GPx tanto en el grupo de Se sólo como en el grupo tratado con QUIN, evidenciando la actividad del Se como un agente antioxidante a través de la estimulación de la actividad de la GPx. Por ello proponemos que el efecto protector principal del Se es debido en gran medida a su acción como centro catalítico de la enzima GPx, proporcionando consecuentemente una protección parcial del daño tóxico estriatal inducido por el QUIN, con importantes implicaciones terapéuticas sobre este modelo experimental de HD.

Es interesante observar que, aunque se sabe que el QUIN afecta tanto los niveles de GSH como el balance GSH/GSSG (Rodríguez-Martínez y col., 2000), así como el metabolismo general de glutatión (Cruz-Aguado y col., 2000), la toxina por sí misma parece no afectar inicialmente la actividad de la GPx (Rodríguez-Martínez y col., 2000; Cruz-Aguado y col., 2000), como se confirma en este trabajo, aunque en contraste, parece ser que, por nuestros resultados, una estimulación de la actividad de la GPx sí resulta en protección significativa contra la neurotoxicidad del QUIN, sugiriendo que aunque este sistema antioxidante endógeno permanece en etapa pasiva ante estímulos excitotóxicos iniciales, su estimulación constituye una alternativa terapéutica potencial en la ocurrencia de los mismos eventos citotóxicos. Adicionalmente, reportes anteriores han mostrado la habilidad que tiene el QUIN para producir $\cdot\text{OH}$ *in vivo* en el cuerpo estriado de rata durante los primeros estadios de toxicidad aguda (Santamaría y col., 2001a), por lo que, al incrementar la actividad basal de GPx estimulada por el Se, ésta bien podría ser responsable de la descomposición del peróxido de hidrógeno generado por el QUIN, y así mediar la protección contra el daño oxidativo vía formación de radicales $\cdot\text{OH}$, cuestión que amerita la realización de estudios más detallados. Esta propuesta se ve apoyada por trabajos experimentales de otros grupos (Rossato y cols., 2002a; Rossato y cols., 2002b) que han probado que el ebselen (EBS), un compuesto seleno-orgánico con actividad de GPx-like, protege homogenizados de cerebro de rata, homogenizados estriatales y tejido estriatal lesionado por QUIN con la consecuente disminución en la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS, otra técnica que se utiliza para la medición de peroxidación lipídica), pero sin encontrar un efecto protector en la conducta de rotación. A

pesar de las discrepancias con dichos estudios, ambos grupos proponemos mecanismos similares de protección del Se en el mismo modelo experimental: protección primaria contra el daño oxidativo.

Por largo tiempo, las características tóxicas que el QUIN produce en el sistema nervioso han servido como modelo de la enfermedad de Huntington (Beal y col., 1986), y debido a su naturaleza endógena, el QUIN ha sido postulado además como una neurotoxina involucrada en diversas enfermedades humanas (Bruyn y Stoof, 1990). Algunos reportes en la literatura han sugerido que las acciones tóxicas del QUIN están predominantemente relacionadas a la sobreactivación de los receptores tipo NMDA (Stone, 1993; Susel y col., 1989) a través de un proceso típico de excitotoxicidad (Kandel y col. 1991). Sin embargo, más recientemente, algunos estudios han demostrado que el QUIN es también capaz de inducir daño oxidativo por sí mismo, debido en gran medida a su estructura química, potenciando con esto un patrón de toxicidad que puede ser parcialmente independiente a la sobreactivación de los NMDAR (Behan y col., 1999; Cabrera y col., 2000; Rodríguez y col., 2000; Santamaría y col., 2001b), sugiriendo así que los atrapadores de radicales libres y los agentes inductores de enzimas antioxidantes, como la melatonina (Behan y col., 1999; Cabrera y col., 2000; Southgate y col., 1998; Southgate y Daya, 1999) y el deprenil (Behan y col., 1999), son agentes terapéuticos potenciales en el modelo de HD dado que muestran protección en tejido nervioso contra la toxicidad inducida por el QUIN bajo condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*. Adicionalmente, el antioxidante OPC-11117 ha mostrado una atenuación importante del daño por QUIN, reduciendo la activación de NF- κ B y la apoptosis vinculada con este factor en el cuerpo estriado de rata (Nakai y col., 1999). Simultáneamente, el perfil de antioxidantes endógenos (GSH/GSSG y SOD) en el SNC inducido se ve alterado por la toxina (Rodríguez y col., 2000), concordando con la reportada capacidad del QUIN de generar \cdot OH *in vivo* en cuerpo estriado de rata durante los primeros estadios de toxicidad aguda (Santamaría y col., 2001b). Notablemente, la formación de \cdot OH inducida por el QUIN, aunque sensible al MK-801 (un conocido antagonista de los NMDAR), no resultó en un bloqueo completo, enfatizando que al menos una pequeña fracción de la toxicidad inducida por el QUIN es independiente de la sobreactivación de receptores tipo NMDA.

En suma, todas estas evidencias soportan la hipótesis de un papel activo de los radicales libres y el estrés oxidativo el patrón de daño neuronal evocado por el QUIN.

Adicionalmente, el presente trabajo demuestra que el selenio provee protección parcial contra dicha neurotoxicidad, sugiriendo que algunas consecuencias fisiopatológicas de la toxicidad debida al QUIN en el cerebro durante la ocurrencia de eventos neurodegenerativos, pueden ser atenuados por acciones antioxidantes contra los efectos de los radicales libres. Por tanto, las evidencias encontradas en este trabajo sugieren el empleo de Se como una alternativa terapéutica potencial en el manejo de enfermedades neurodegenerativas que cursen con eventos de excitotoxicidad y daño oxidativo.

CONCLUSIONES

VII

- I. La administración tópica de QUIN al estriado de ratas alteró los diferentes marcadores de daño neuronal y oxidativo probados en el estudio.
- II. La acción del selenio ante a la lipoperoxidación inducida por QUIN mostró una tendencia protectora.
- III. La actividad de la glutatión peroxidasa se incrementó por efecto del Se, así como en el grupo de animales tratados con QUIN + Se, sugiriendo un efecto estimulador del Se sobre la actividad de la GPx.
- IV. El selenio abatió la conducta rotacional producida por QUIN en ratas como evidencia de la preservación.
- V. El Se disminuyó las alteraciones morfológicas y la tasa de daño neuronal en el cuerpo estriado de animales lesionados con QUIN.
- VI. El Se atenuó la disminución estriatal de GABA inducida por QUIN en ratas.
- VII. Se demostró el efecto neuroprotector del selenio en el modelo de la enfermedad de Huntington en los diferentes marcadores evaluados, sugiriéndose un mecanismo de protección antioxidante temprana a través de la activación de la GPx o por sí mismo.
- VIII. Se considera la necesidad de realizar estudios más detallados para adquirir un conocimiento más profundo acerca de los mecanismos por los cuales el selenio ejerce su protección.

☞ BIBLIOGRAFÍA ☞

VIII

- Adams R.D., Maurice V., and Ropper A.H. (1999) Principios de Neurología. McGraw-Hill 6a edición Interamericana editores, s.a. de c.v.: capítulos: 4, 37.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (2002) Biología Molecular de la Célula. 3ª edición omega, 581-583.
- Aguado C.R., Francis Turner L., Díaz C.M., Antunez I. (2000) Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem. International*, **37**, 53-60.
- Akerboom T.P.M., Sies H. (1981) Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods. Enzymol.* **77**, 373-382.
- Albin R.L., Young A.B., Penney J. B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *T.I.N.S.*, **12**, 366-375.
- Alexander G. E. and Delong M. R. (1992) Mechanism of the initiation and control of movement. *Clinical Neurobiol.* 2nd ed. Philadelphia, Saunders, chap **21**, 285-308.
- Allen R. C. (1994) Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. *Environ Health Perspect.* **102**, 201-208.
- Aronin N., Cooper P.E., Lorenz L.J. Bird E.D., Sagar S.M., Leeman S.E., Martin J.B. (1983) Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington disease. *Ann. Neurol.* **13**, 519-526.
- Awasthi Y.C., Beutler E., Srivastava S.K. (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **250**, 5144-5149.
- Babior B. M. (1994) Activation of the respiratory burst oxidase. *Environ Health Perspect.* **102**, 53-56.
- Beadle G.W., Mitchell H.K. (1947) Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophan in neurospora. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **33**, 155-158.
- Beal M. Flint, Kowall N. E., Ellison D.W., Mazurek M.F., Swartz Kenton J. and Martin J.B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature.* **321**, 168-171.

- Beal M. F. and Mazurek M.F. (1986) Neuropeptido Y is increased in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **20**, 547.
- Beal M. F., Bird E.D., Langlais P.J., Martin J.B. (1984) Somatostatin is increased in the nucleus accumbens Huntington's disease. *Neurology.* **34**, 663-666.
- Beilstein M.A. and Whanger P.D. (1987) Metabolism of selenomethionine and effects of interacting compounds by mammalian cells in culture. *J. Inorg. Biochem.* **29**, 137-152.
- Behan W.M.H., McDonald M., Darlington L.G. and Stone T.W. (1999) Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 1754-1760.
- Bender D.A., and McCreanor, G.M. (1989a) The preferred route of Kynurenine metabolism in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **717**, 56-60.
- Bender D.A. (1989b) The kynurenine pathway of Tryptophan metabolism in Quinolinic Acid and the Kynurenines. *C.R.C. Press. Fl.* 3-38.
- Bernheimer H., Hanykiewicz O. (1973) Brain amines in Huntington's chorea. *Adv. Neurol.* **1**, 525-527.
- Bird E.D., Iversen L.L. (1974) Huntington's chorea : Postmortem measurement of glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase and dipamine in basal ganglia. *Brain.* **97**, 457-458.
- Björnstedt M., Odlander B., Kuprin S., Claesson H-E., Holmgren A. (1996) Selenite incubated with NADPH and mammalian thioredoxin reductase yields selenide, which inhibits lipoxygenase and changes the electron spin resonance spectrum of the active site iron. *Biochemistry.* **35**, 8511-8516.
- Björnstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B., Holmgren A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol Chem.* **269**, 382-384.
- Blaustein M. P. and King C. (1976) Influence of membrane potential on the sodium-dependent uptake of gamma-aminobutyric acid by presynaptic nerve terminals: experimental observations and theoretical considerations. *J. Membr. Biol.* **30**, 153-173.
- Block F., Kunkel M. and Schwarcz M. (1993) Quinolinic acid lesion of the stratum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci. Lett.* **149**, 126-128.
- Bordelon Y.M., Chesselet M-F., Nelson D., Welsh F., Erecinska M. (1997) Energetic Dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.* **69** (4), 1629-1639.
- Bowery N. G. (1993) GABA-B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 109-147.

- Brackenridge C. J. (1971) The relation of type of initial symptoms and line of transmission to ages at onset and death in Huntington's disease. *Clinic. Genet.* **2**, 287-297.
- Brigellus-Flohé R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol. Med.* **27**, 951-965.
- Britton J.W., Uitti R.J. Ahlskog J.E. (1995) Hereditary late-onset chorea with out significant dementia. *Neurology.* **45**, 443-452.
- Bruyn GW, von Wolfen WJ. (1973) Pathogenesis of Huntington's chorea. *Lancet* **1**(7816), 1382.
- Bruyn GW. (1966) Biochemical studies in Huntington's chorea. 3. Aminoacids in serum and urine. *Psychiatr. Neurol. Neurochim.* **69**(2), 139-42.
- Bruyn G.W., Bots G., and Dom R. (1983) Huntington's chorea. *J. Med. Genet.* **20**, 76-80.
- Bruyn R.P.M. and Stoof J.C. (1990) The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* **95**, 29-38.
- Bugiani O., Tabaton M., Cammarata S. (1984) Huntington Disease: survival of large striatal neurons in the rigid variant. *Ann. Neurol.* **15** (2), 154-156.
- Byers R.K., Gilles F.H., Fung C. (1973) Huntington's disease in children: Neuropathologic study of four cases. *Neurology* **23**, 561-563.
- Cabrera J., Reiter R.J., Tan D-X, Qi W. Sainz R.M., Mayo J.C., García J.J., Kim S.J., and El-Sokkary G. (2000) Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. *Neuropharmacol.* **39**, 507-514.
- Cardenas E., Packer L., Deckk M. (2002) Handbook of antioxidants 2a Ed.
- Castaño A., Cano J., Machado A. (1993) Low Selenium Diet Affects Monoamine Turnover Differentially in Substantia Nigra and Striatum. *J. Neurochem.* **61**(4), 1302-1307.
- Chandler J.H., Reed T.E., De Jong R.N. (1960) Huntington's chorea in Michigan. *Neurology* **10**, 148.
- Cheng W. H., Ho Y.S., Valentine B.A., Ross D.A., Combs G.F., Lei X.G. (1988) Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J. Nutr.* **128**, 1070-1076.
- Choi. D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.

- Collingridge G.L. and Lester R.A. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate CNS. *Pharmacol. Rev.* **40**, 143-208.
- Conneally P.M. (1984) Huntington disease : Genetics and epidemiology. *Am. J. Hum. Genet.* **36**, 506-526.
- Cote L. (1985) Aging of the brain and dementia. *Elsevier Science Publishing Co.*, 784-792.
- Cotton F.A., Wilkinson G. (2001) Química Inorgánica Avanzada. Limusa Noriega Editores, México.
- Cruz-Aguado R., Francis-turner L., Díaz C.M. and Antúnez Y. (2000) Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *J. Neurochem.* **61**, 1302-1307.
- Davenport C.B. (1915) Huntington's chorea in relation to heredity and eugenics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1**, 283.
- Dawbarn D., De Quidt M.E., Emson P.C. (1985) Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurones in Huntington's disease. *Brain Res.* **340** (2), 251-260.
- DeJong R.N. (1973) The history of Huntington's chorea in the United States of America. *Raven. Press.*, 19-27.
- Denny-Brown D., (1962) the basal ganglia and their relation to disorders of movement. London, Oxford University Press, cap 1,3,5.
- Diplock A.T. (1978) The biological function of vitamin E and the nature of the interaction of the vitamin with selenium. *World Rev. Nutr. Diet.* **31**, 178-183.
- El-Defrawy S.R., Boegman R.J., Jhamandas K., Beninger R.J. (1986) The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**(3), 369-375.
- Ellinger A. (1904) Die entstehung der Kinurensaure. *Z. Physiol. Chem.* **43**, 325-337
- Enna S. J. (1985) Biochemical and electrophysiological characteristics of mammalian GABA receptors. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 907-912.
- Fahn S. (1976) GABA in nervous system function. *Raven. Press.*, 169-174.
- Farrer L.A., Conneally M. (1987) Predictability of phenotype of Huntington's disease. *Arch. Neurol.* **44**, 109-114.
- Feldman P.L., Griffith, O.W., and Stuehr D.J. (1993) The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News.* **71**, 26-38.

- Ferrante R.J., Kowall .W., Beal M.F., Richardson E.P., Bird E.D., Martín J.B. (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* **230**(4725), 561-563.
- Fletcher McDowell and Jesse M. Cedarbaum (1998) The extrapyramidal system and disorders of movement. *Clinical Neurology*, **3**, Cap 38.
- Fleury M. O. and Ashley D.V. (1983) High-performance liquid chromatography analysis of amino acids in physiological fluids: on line precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* **133**, 330-335.
- Flohé L., Günzler WA., Schock H.H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**, 132-134.
- Flohé L., Wingender E., Brigelius-Flohé R. (1997) The regulation of glutathione peroxidases. *Oxidative Stress and Signal Transductions*. New York: Chapman & Hall, 415-435.
- Forloni G.L., Angeretti N., Rizzi M., Vezzani A. (1992) Chronic infusion of quinolinic acid in rat striatum: effects on discrete neuronal populations. *J. Neurol. Sci.* **108**(2), 129-136.
- Forno L.S., Jose C. (1973) Huntington's chorea-a pathologic study. *Adv. Neurol.* **1**, 453-455.
- Forno L.S., Norville R.L. (1979) Ultrastructure of the neostriatum in Huntington's and Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **3**, 123.
- Foster A.C., Miller L.P. Oldendorf W.H. and Schwarcz R. (1984a) Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat. *Exp. Neurol.* **84**, 428-440
- Foster A.C., Vezzani A., French E.D.; Schwarcz R. (1984b) Kinurenic acid blocks nesurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* **48**(3), 273-278.
- Foster A.C., Whetsell W.O. Jr., Bird E.D., Schwarcz R. (1985) Quinolinic acid phosphoribyltransferase in human and rat brain: activity in Huntington's disease and in quinolinate-lesioned rat striatum. *Brain Res.* **336**(2), 207-214.
- Furchgott R.F. and Vanhoutte P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**, 2007-2018.
- Furchgott R.F. and Zawadzki J.V., (1980) The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.

- Gale K. and Casu M. (1981) Dynamic utilization of GABA in substantia nigra: regulation by dopamine and GABA in the striatum, and its clinical and behavioral implications. *Molecular and Cellular Biochem.* **39**, 369-405.
- Ganther H.E. (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* **20**(9), 1657-1666.
- Gholson R.K., Ueda I. Ogasawara N. and Henderson L.M. (1964) The enzymatic conversion of quinolinate to nicotinic acid mononucleotide in mammalian liver. *J. Biol. Chem.* **239**, 1208-1214.
- Gilbert and Colton. (1999) Reactive Oxygen Species in Biological Systems. Edited by. Kluwer Academic / Plenum publishers N.Y. Cap. 1-4,8,-11,13.
- Gravelord G.A. (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington Disease. *Science* **22**, 770-773.
- Guillemin G.J., Kerr S.J., Smythe G.A., Smith D.G., Kapoor V., Armati P.J., Croitoru J., BrewB.J. (2001) Kinurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J. Neurochem.* **78**(4), 842-853.
- Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M. et al (1983) A polymorphic DNA marker, genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234.
- Haan J.B., Bladier C., Griffiths P., Kelner M., O'Shea R. D., Cheung N. S., Bronson R. T., Silvestro M. J., Wild S., Zheng S.S., Beart P. M., Hertzog P. J., Kola I. (1988) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx 1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **22**, 528-536.
- Hablitz J.J. and Langmøen Y. A. (1982) Excitation of hippocampal pyramidal cells by glutamate in the guinea pig and rat. *J. Physiol.* **325**, 317-331.
- Haffeman D. G. (1974) Effect of Dietary Selenium on Erythrocyte and Liver Glutathione Peroxidase in the Rat. *J. Nutr.* **104**, 508-587.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* **23**, 1396-1397.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford. *Clarendon Press.* 368-415.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1992) Free Radicals, antioxidants and human disease : where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 598-620 .
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (2000) Free Radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications. Cap.4.

- Hantraye P., Richie D., Maziere M. and Isacson O. (1990) A primate model of Huntington's disease.: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp. Neurol.* **108**, 91-104.
- Harman D. (1993) Free radicals and age-related diseases. In *Free Radicals in Aging* (de. Pal Y.B.), *C.R.C. Press. U.S.A.*, 205-222.
- Harris C.A., Miranda A.F., Tanguay J.J., Boegman R.J., Beninger R.J., Jhamandas K. (1998) Modulation of striatal quinolinate neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *Br. J. Pharmacol.* **124**(2), 391-399.
- Hernández-Luis F. (2000) "Apuntes de Toxicología". Unidad de posgrado, depto. de farmacia, Facultad de Química UNAM.
- Hayden M.R., Hopkins H.C., Macrea M. Beighton P.H.(1981) The origin of Huntington's chorea the Afrikaner population of South Africa. *S. Afr. Med. J.* **58**(5), 287-290.
- Heyes M.P. and Markey S.P. (1988) Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. *Anal. Biochem.* **174**, 349-359.
- Heyes M.P., Rubinow D., Lane C., and Markey S.P. (1989) Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann. Neurol.* **26**, 275-277.
- Heyes M.P., Brew B.J., Martin A., Price. R. W., Salazar A.M., Sidtis J.J., Yergely J.A., Mourdain M.M., Sadler A.E. , Keilp J., Rubinow D. and markey S.P. (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection : relationship to clinical and neurologic status. *Ann. Neurol.* **29**, 202-209.
- Heyes M.P., Sito K. and Markey S.P. (1992a) Human macrophages convert L-Tryptophan in to the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem. J.* **283**, 633-635.
- Heyes M.P., Jourdain E.K., Lee K., Saito K., Frank J.A., Snoy P.J., Markey S.P., and Gravel M. (1992b) Relationship of neurologic status in macaques infected with the simian immunodeficiency virus to cerebrospinal fluid quinolinic acid and kynurenic acid. *Brain Res.* **570**, 237-250.
- Heyes M.P., Mefford I.N., Quearry B.J., Dedhia M. and Lackner A. (1990a) Increased ratio of quinolinic acid to kynurenic acid in cerebrospinal fluid of D-retrovirus-infected Rhesus macaques: relationship to clinical and viral status. *Ann. Neurol.* **27**, 666-675.
- Heyes M.P. and Lackner A. (1990b) Increased cerebrospinal fluid quinolinic acid, kynurenic acid and L-kynurenine in acute septicemia. *J. Neurochem.* **55**, 338-341.

- Heyes M.P., Saito K., Crowley J.S., Davis L.E., Demitrack M.A., Der M., Dilling L.A., Elia J., Kruesi M.J.P., Lackner A., Larsen S.A., Lee K., Leonard H.L., Markey S.P., Martin A., Milstein S., Mouradian M.M., Pranzatelli M.R., Quearry B.J., Salazar A., Smith M., Strauss S.E., Sunderland T., Swedo S.W. and Tourtellotte W.W. (1992) Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* **115**, 1249-1273.
- Heyes MP, Markey SP. (1988) Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. *Anal. Biochem.* **174**(1), 349-59.
- Higuchi K., Hayaishi O. (1967) Enzymic formation of D-Kinurenine from D-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 397-403.
- Hirsch E.C. (1992) Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **32**, S88-S93.
- Hoestra W.G. (1975) Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed. Proc.* **34**, 2083-2089.
- Hsieh HS., Gantehar HE. (1977) Biosynthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in rat liver and kidney cell-free systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **497**, 205-217.
- Ignarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M., Rogers N.E. (1993) Oxidation of Nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8103-8107.
- Ignarro L. J., (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 535-560.
- Imam S.Z., Newport G.D., Islam F., Slikker Jr. W., Ali S.F. (1999) Selenium, an antioxidant, protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Brain Res.* **818**, 575-578.
- Ishikawa T., Okuno E., Tsujimoto M., Nakamura M. (1991) Kynurenine-pyruvate aminotransferase in rat kidney and brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **294**, 567-572.
- Kiernan Jhon A. (2000) "Barr" El sistema nervioso humano. MacGraw-Hill Interamericana, editores, 7a edición.
- Kandel E., James H. Schwartz, Thomas M. J. (1991) Principles of neural science. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut 3a ed.
- Kohler C., Okuno E. and Schwarcz R. (1985) *Neurosci. Absir.* **11**, 820.

- Kordower J. H., Isaccson O., and Emerich D.F. (1999) Cellular Delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible?. *Exp./Neurol.* **159**, 4-20.
- Krosggaard-Larsen P. (1988) GABA synaptic mechanisms: stereochemical and conformational requirements. *Med. Res. Rev.* **8**, 27-56.
- Lange H., Thorner G., Hopf A., Schroder K.F. (1976) Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J. Neurol. Sci.* **28**(4), 401-25.
- Lapin I.P. (1978a) Stimulant and convulsive effects of kynurenines ejected into brain ventricles in mice. *J. Eur. Neural. Transm.* **42**, 37-43.
- Lapin I.P. (1978b) Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol. Res. Comun.* **10**, 81-83.
- Lapin I.P. (1981a) Kynurenines and seizures. *Epilepsia* **22**, 257-265.
- Lapin I.P. (1981b) Antagonism of glycine to seizures induced by L-Kynurenine, Quinolinic Acid and Estrychnine in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **71**, 495-498.
- Lapin I.P. (1982) Convulsant action of intracerebroventricularly administered L-kynurenine sulphate, quinolinic acid and other derivatives of succinic acid, and effects of amino acids: structure-activity relationships. *Neuropharmacol.* **21**(12), 1227-33.
- Lasker A.G., Zee D.S., Hain T.C. (1987) Saccades in Huntington's disease: initiation defects and distractibility. *Neurology* **37**, 364.
- Leigh R.J., Newman S.A. Folstein S.E. (1983) Abnormal ocular motor control in Huntington's disease. *Neurology* **33**, 1268-1273.
- Leidenhermer N.J., Browning M.D., Harris R.A. (1991) GABA-A receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. *Trends. Pharmacol. Sci.* **12**, 84-87.
- Leist M., Maurer S., Schultz M., Elsner A., Gawlik D., Brigelius-Flohé R. (1999) Cytoprotection against lipid hydroperoxides correlates with increased glutathione peroxidase activities, but not selenium uptake from different selenocompounds. *Biol. Trace. Elem. Res.* **68**, 159-174.
- Lehrman E., Molinari A., Speciale C., Szwarcz R. (2001) Immunohistochemical visualization of newly formed quinolinate in the normal and excitotoxically lesioned rat striatum. *Exp. Brain Res.* **141**(3), 389-397.
- Levander O.A. (1991) Scientific rationale for the 1989 recommended dietary allowance for selenium. *J. Am. Diet. Assoc.* **91**, 1572-1576.

- Liles S.L., Davis G.D. (1969) Electrocofctical effects of caudate stimulations which alter cortically induced movement. *J. Neurophysiol.* **32**(4), 574-582.
- Lloyd K. G. and Morselli P. L. (1983) Psychopharmacology of GABAergic drugs. *Raven. Press.*, 183-203.
- Lombardi G., Moneti G. and Moroni F. (1983a) Mass-fragmentographic identification and measurement of the excitotoxin quinolinic acid in the mammalian brain . *Acta. Pharmacol. Toxicol.* **53** (Suppl. 1), 145.
- Lombardi GC., Carla V., Moneti G. and Moroni F. (1983b) Developmental Changes of de content and synthesis of quinolinic acid in the brain rat. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* **53** (Suppl. 1), 24-27.
- Lombardi G., Zanoni R. and Moroni F. (1989) Systemics treatments with GM1 ganglioside reduce Quinolinic acid induced striatal in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **174**, 123-125.
- Long C.L., Hill H.N. Weinstock I.M. and Henderson L.M. (1954) Studies of the enzymatic transformation of 3-hydroxyanthranilate to quinolinate. *J. Biol. Chem.* **211**, 405-417.
- Lowry O. H., Rosebrogh N.J., Farr A.L. Rondall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Luddens H. and Wisden W. (1991) Function and pharmacology of multiple GABA-A receptor subunits. *Trends. Pharmacol. Sci.* **12**, 49-51.
- Martin J.B. (1984) Huntington's disease: approaches to an old problem. *Neurol.* **34**, 1059.
- McCord J. M. (1992) Superoxide production and human disease. *C.R.C. Press.*, 225-239.
- McGeer P.L. McGeer E.G., Fibigen H.C., (1973) Choline acetylase and Glutamic acid and decarboxylase in Huntington's chorea. *Neurol.* **23**, 912.
- Maksimovic I.D., Jovanovic M.D., Colic M., Mihajlovic R., Mivic D., Selakovic V., Ninkovic M., Malicevic Z., Rusic-Stojijkovic M., Jovicic A. (2001) Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. *Vojnosanit Pregl.* **58**(3), 273-242.
- McMurry (2002) Química organica. 4a edición, Harper.Cap. 13.
- Gilbert and Colton. (1999) Reactive Oxygen Species in Biological Systems Edited by. Kluwer Academic / Plenum publishers N.Y. Cap. 1,2,3,4,8,9,10,11,13.
- Stryer Lubert (1999) Bioquímica. 4a edición, Reverte. Cap. 6, 9.

- Yuoman Joulian R. (1997) Neurological surgery. 4a edition by W.B. Saunders Co. Cap. 3, 5.
- Martin J.B. (1984) Genetic testing in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **16**, 511.
- Martin JB. and Gusella JF. (1986) Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N. Engl. J. Med.* **315**(20), 267-1276.
- Martin J.B. and Gusella J.F. (1986) *New Engl. J. Med.* **315**, 1267-1276.
- Martin D. L. (1976) GABA in Nervous System Function. *Raven. Press, N.Y.*, 347-386.
- Mazzari S., Aldinio C., Beccaro M., Toffano G., Sxhwarcz R. (1986) Intracerebral quinolini acid injection in the rat: effects on dopaminergic neurons. *Brain. Res.* **380**(2), 309-316.
- McCaugher W.Y. (1961) The pathologies espectrum of Huntington's chorea. *J. Nerv. Ment. Dis.* **133**, 91.
- Mills Gordon C. (1959) The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **234**(3), 502-506.
- Minatogawa Y., Noguchi T. and Kido R. (1974) Kynurenate pyruvate transaminase in rat brain. *J. Neurochem.* **23**, 271-272.
- Moncada S., Palmer R.M.J., and Higgs E.A., (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
- Moroni F., Lombardi G., Carla V. and Moneti G. (1984a) The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res.* **285**, 352-355.
- Moroni F., Lombardi G., Moneti G. and Aldinio C. (1984b) The excitotoxin 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.
- Moroni F., Lombardi G., Karla V., Pellegrini D., Carassale G.L. and Cortesini C. (1986) Content of quinolinic acid and of other tryptophan mmetabolites increases in brain regions of rats used as experimental models of hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* **46**, 869-874.
- Moroni F., Lombardi G. Carla V. (1989) The measurement of quinolinic acid in the mammalian brain: neuropharmacological and physiological studies. *C.R.C. press., Boca raton, F.*, 123-126.
- Nakai M., Qin Z.H., Wang Y., and Chase T.N. (1999) Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NFkB activation and apoptosis in rat striatum. *Molec. Brain Res.* **64**, 59-68.

- Nemerof C.B., Youngblood W.W., Manberg P.J., Prange A.J., Kizer J.S. (1983) Regional brain concentrations of neuropeptides in Huntington's chorea and schizophrenia. *Science* **221**, 972-975.
- Nève J. (1995) Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* **9**, 65-73.
- Norman A. B., Wyatt L. M., Hildebrand J. P., Kolmonpunporn M., Moody C. A., Lehman M. N. and Sanber P. R. (1990) Sensitization of rotation behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine or kainic acid-induced striatal lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **37**, 755-759.
- Obrenovitch T.P. (2001) Quinolinic acid accumulation during neuroinflammation. Does it imply excitotoxicity?. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **939**, 1-10.
- Ogawa T., Matson W.R., Beal M.F., Myers R.H., Bird E.D., Milbury P. and Saso S. (1992) Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurol.* **42**, 1702-1706.
- Oh S.H., Ganther H.E., Hoeskstra W.G. (1974) Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes. *Biochem.* **13**, 1825-1829.
- Okuno E., Schmidt W., Parks D.A., Nakamura M., Schwarcz R. (1991a) Measurement of rat brain Kynurenine aminotransferase at physiological Kynurenine concentrations. *J. Neurochem.* **57**, 533-540.
- Perkins M.N. and Stone T.W. (1982) An iontophoretic investigation of the actions of convulsant Kynurenines and their interaction with endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.* **274**, 184-187.
- Perkins M.N. and Stone T.W. (1983a) Quinolinic acid: Regional variations in neural sensitivity. *Brain Res.* **259**, 172-176.
- Perkins M.N. and Stone T.W. (1983b) Pharmacology and regional variations of Quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 551-557.
- Peter K.M., Kim Young-Guen Kwon, Hun-Taeg Chung and Young-Myeong Kim (2002) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **962**, 42-52.
- Peters J.C. (1991) : Tryptophan nutrition and metabolism: and overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* **294**, 345-358.
- Platenik J., Stopka P., Vejrazka M., Stipek S. (2001) Quinolinic acid-iron (II) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction. *Free Radic. Res.* **34**(5), 445-459.

- Pogrebnyaya V.L., Usov A.P., Baranov A.V. Nesterenko A.I. (1975) Oxidation of nitric oxide by oxygen in the liquid phase, *Zh. Prikl. Khim. (English Trans.)* **48**, 1004-1007.
- Price L.H., Charney, D.S., Delgado P.L., Goodman W.K., Krystal J.H., Woods S.W. and Henninger G.R. (1990) Clinical studies of 5-HT function using i.v. L-Tryptophan. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **14**, 459-472.
- Reynolds G.P. and Pearson S.J. (1987) Decreased glutamic acid and increased 5-hydroxytryptamine in Huntington's disease brain. *Neurosci. Lett.* **78**, 233-238.
- Rice-Evans Catherine and Burdon Roy. (1993) Free Radical-Lipid Interactions and their Pathological Consequences. *Prog. Lipid. Res.* **32**(1), 71-110.
- Ríos C. and Santamaría A. (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* **16**, 1139-1143.
- Roberts R. C., Du F., McCarthy K.E., Okuno E., Sxhwartz R. (1992) Immunocytochemical localisation of kynurenine aminotransferase in the rat striatum - a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* **326**, 82-90.
- Robert J., Joynt M.O., Robert C., Griggs M.O. (1998) Lippincott company philadelphia *Clinical. Neurol.* **3**, cap.38.
- Röcher C., Lalanne J.L., Chaudiekère J. (1992) Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. *Eur. J. biochem.* **205**, 955-960.
- Rodríguez E., Méndez-Armenta M., Villeda-Hernández J., Galván-Arzate S., Barroso-Moguel R., Rodríguez F., Ríos C., Santamaría A. (1999) Dapsona prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicol.* **139**(50), 111-118.
- Rodríguez-Martínez E., Camacho A., Maldonado P.D., Pedraza-Chaverri J., Santamaría D., Galván-Arzate S., Santamaría A. (2000) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* **858**(2), 436-439.
- Rossato J.I., Ketzler L.A., Centuriao F.B., Silva S.J., Ludtke D.S.k, Zeni G., Braga A.L., Rubin M.A., and Rocha J.B. (2002a) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **27**, 197-303.
- Rossato J. Y., Zeni G., Mello C.F., Rubin M.A., and Rocha J.B. (2002b) Ebsele blocks the quinolinic acid-induced production of thobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci. Lett.* **318**, 137-140.
- Roskoski R. Jr. (1981) Comparison of DABA and GABA transport into plasma membrane vesicles derived from synaptosomes. *J. Neurochem.* **36**, 544-550.

- Rotruck J.T., Hoekstra W.G., Pope A.L., Ganther H.; Swanson A., Hafeman D. (1972) Relationship of selenium to GSH peroxidase. *Fed. Proc.* **31**, 691.
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H., Swanson A., Hafeman D., Hoekstra W.G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-690.
- Russi P., Pellicciari R., Gallo-Mezo M., Moneti G. and Moroni F. (1991) In vivo studies on the synthesis of quinolinic and kynurenic acids in the rat brain and other organs. *Raven. Press. N.Y.* 343-352.
- Sanberg P.R., Calderon S.F., Giordano M., Tew J.M. and Norman A.B. (1989) The quinolinic acid model of Huntington's disease: locomotor abnormalities. *Exp. Neurol.* **105**, 45-53.
- Sang-Oh Yoon, Moon-Moo Kim, Soo-Jin Park, Dohoon Kim, Jongkyeong Chung and An-Sik Chung (2001) Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI₃-K/Akt pathways. *The FASEB Journal (express article 10.1096/fj.01-0398fje.)* Published online November 14.
- Santamaría A. and 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.
- Santamaría A., Ríos C., Solís-Hernández F., Ordaz-Moreno J., González-Reynoso L., Altigracia M., Kravzoq J. (1996) System DL-kynurenic acid and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacol.* **35**, 23-28.
- Santamaría A., Ordaz-Moreno J., Rubio-Osorio M., Solís-Hernández F., Ríos C. (1997a) Neuroprotective effect of dapsone against quinolinic- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **81**, 271-275.
- Santamaría A., Galván-Arzate S., Lisy V., Alí S.F., Duhart H.M., Osorio-Rico L., Ríos C., St'astny F. (2001a) Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *Neuroreport* **12**(4), 871-874.
- Santamaría A., Jiménez-Capdeville M.E., Camacho A., Rodríguez-Martínez E. Flores A. and Galván-Arzate S. (2001b) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *NeuroReport* **12**, 2693-2696.
- Savaskan N.E., Bräuer A.U., Kühbacher M., Eyüpoglu I.Y., Kyriakopoulos A., Ninnemann O., Behne D. and Nitsch R. (2002) Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *The FASEB Journal Express Article 10.1096/fj.02-006fje* Published online November 1.

- Schousboe A., Larsson O.M., Krogsgaard-Larsen P. (1991) GABA uptake inhibitors as anticonvulsants. In: Tunncliffe G, Raess BU, eds. *GABA mechanisms in epilepsy*. N.Y. Wiley Liss, 165-87.
- Schwarcz R. and Du F. (1991) Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **294**, 185-199.
- Schwarcz R. D. (1988) The GABA-A receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 3369-3378.
- Schwarcz R.D., Okuno E., White R.J., Bird E.D., Whetsell W.O. Jr. (1988) 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4079-4081.
- Schwarcz R., Whetsell W.O. and Mangano R. M. (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* **219**, 316-319.
- Schwarcz R., Roster A. C., French E.D., Whetsell W.O., Jr. and Kohler C. (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* **35**, 19-32.
- Schwarcz R., Fuxe K., Agnati L., Hockfelt T. and Coyle J. T. (1979) Rotational behavior in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: A behavioral model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res.* **170**, 485-495.
- Schwarz K. and Foltz CM. (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3292-3293.
- Seko Y. and Imura N. (1997) Active oxygen generation as a possible mechanism of selenium toxicity. *Biomed. Environ. Sci.* **10**, 333-339.
- Seko Y., Saito Y., Kitara J., Imura N. (1989) Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendenl A,ed. *Selenium in Biology and Medicine*. Berlin: Springer Verlag. 70-73.
- Shoenfeld M., Myers R.H., Cupples L.A. (1984) Increased rate of suicide among patients with Huntington's disease *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **47**, 1283-1290.
- Shoulson I. (1984) Huntington's disease: a decade of progress. *Neurol. Clin.* **2**, 515-526.
- Smith R. J. and Panico K.A. (1985) Automated analysis of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography. *Liquid Chrom.* **8**, 1783-1795.
- Smith C.V. (1991) Correlations and apparent contradictions in assessment of oxidant stress status in vivo. *Free Biol. Med.* **10** (3-4), 217-224.

- Southgate G.S., Daya S., and Potgieter B. (1998) Melatonin plays a protective role in quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *J. Chem. Neuroanat.* **14**, 151-156.
- Southgate G.S., and Daya S. (1999) Melatonin reduces quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat brain homogenate. *Metab. Brain Dis.* **14**, 165-171.
- Spallholz Julian E. (1994) On The Nature of Selenium Toxicity and Carcinostatic Activity. *Free Radicals and Med.* **17**(1), 45-64.
- Speciale C. and Schwarcz R. (1988) Effect of systemic kainate administration on cerebral quinolinic acid metabolism in the rat. *Exp. Neurol.* **99**, 213-218.
- Speciale C. and Schwarcz R. (1991) On the disposition of de novo synthesized quinolinic acid in rat brain tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* **294**, 583-586.
- Spokes E.G. (1981) The neurochemistry of Huntington's chorea. *Trends. Neurosci.* **4**, 115-118.
- Stone T.W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.* **45**, 303-309.
- Stone T. W. and Burton N. R. (1988) NMDA receptors and their endogenous ligands in vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.* **30**, 333-368.
- Stone Y.W., and Connick J.H. (1985) Quinolinic acid and other Kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience* **15**, 597-617.
- Stone Y.W., and Perkins M.N. (1981) Quinolinic acid : a potent endogenous excitant at amino acid receptors in receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* **72**, 411-412.
- Stryer Lubert (1999) "Bioquímica" 4a edición, Reverte. Cap. 6.
- Susel Z., Engber T. M., and Chase T. N. (1989) Behavioral evaluation of the antiepileptotoxic properties of MK-801: comparison with neurochemical measurements. *Neurosci. Lett.* **104**, 125-129.
- Suzdak P. D. and Jansen J. A. (1995) A Review of the Preclinical Pharmacology of Tiagabine: A Potent and Selective Anticonvulsant GABA Uptake Inhibitor. *Epilepsia* **36**(6), 612-626.
- Tapia R. (1983) γ -Aminobutyric Acid Metabolism and Biochemistry of Synaptic Transmission. *Handbook of Neurochem.* **3**, 423-466.
- Thach WT Jr. and Montgomery EB Jr. (1992) Motor System, in Perlman AL. Collins RC eds. *Neurobiol. of Disease. N.Y. Oxford University Press.* 168-196.

- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-978.
- Triggs W. J. and Willmore L. J. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* **42**, 676-979.
- Turski W.A., Gramsbergen J.B., Traitler H. and Sxhwarcz R. (1989) Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kinurenine. *J. Neurochem.* **52**, 1629-1636.
- Ursini F., Maiorino M., Ferrini L., Gegin C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.* **710**, 197-211.
- Ursini F., Maiorino M. Gregolin C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hidroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **839**, 62-70.
- Ursini F., Bindoli A. (1987) The role of selenium peroxidase in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **44**, 255-276.
- Van der Heyden J. and Korf J. (1978) Regional levels of GABA in the brain: rapid semiautomated assay and prevention of postmortem increase by 3-mercapto-propionic acid. *J. Neurochem.* **31**, 197-203.
- Van Dijk J.G. Van Der Velde E.A. Roos RAC. (1986) Juvenile Huntington's disease. *Hum. Genet.* **73**, 235-245.
- Vendeland S.C., Deagen J.T., Butler J.A., Whanger P.D. (1994) Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biomaterials* **7**, 305-312.
- Vender A.D. (1975) The kynurenic pathway of tryptophan catabolism. *Amino Acid Metabolism. John Wiley and Sons. U.S.A.*, 172-177.
- Veres Z., Kim IY., Scholz T., Stadtman T. (1994) Selenofosfato sintetasa. Enzyme properties and catalytic reaction. *J. Biol. Chem.* **269**, 10597-10603.
- Vessie P.R. (1932) On the transmission of Huntington Chorea for 300 years: The Bures family group. *J. Nerv. Ment. Dis.* **76**, 553-555.
- Vicini S. (1991) Pharmacological significance of the structural heterogeneity of the GABA-A receptor-chloride ion channel complex. *Neuropsychopharmacol.* **4(9)**, 14.
- Von Sattel J.P., Myers Rit, Stevens T.J.y cols., (1985) Neurological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 559.

- Watkins J.C. and Evans R.H. (1981) Excitatory amino acid transmitter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**, 165-204.
- Wechsler D. (1994) *The measurement of adult Intelligence, 3rd edition* Baltimore Williams & Wilkins. Cap. 7.
- Wilson SAK (1940) *Neurology*. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Foster A.C., Whetsell W.O., Schwarcz R. (1983) *Neurosci. Lett.* **41**,(3), 247-252.
- Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Foster A.C., Whetsell W.O. Jr. and Schwarcz R. (1984) Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.* **41**, 247-252.
- Yamamoto Y. and Takahashi K. (1993) Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 541-545.
- Yuoman Joulain R. (1997) *Neurological surgery 4a edition by W.B. Saunders Co., Cap. 6, II.*
- Young A.B., Shoulson Y., Penney J.B. (1986) Huntington's disease in Venezuela: Neurologic features and functional decline. *Neurology* **36**, 244-250.
- Young A.B., Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. (1988) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* **241**(4868), 981-983.
- Young A.B. (1997) Impairment of energy metabolism and excitotoxic cell death in Huntington disease. *Rev. Neurol.* **153** (8-9), 496-8. Review.
- Yeh-JY, Vendeland Gu Q., Butler J.A., Ou B.R., Whanger P. (1997) Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues. *J. Nutr.* **127**, 2165-2172.
- Zentella M., Corona S. Saldaña Y. (1994) Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *Bol. Educ. Bioq.* **13**(3), 87-93.
- Zentella M., Corona S. Saldaña Y. (1994) papel fisiológico de los radicales libres. *Bol. Educ. Bioq.* **15**(4), 152-161.
- Zia Suhaila and Islam Fankhrul (2000) Selenium Altered the Levels of Lipids, Lipid Peroxidation, and Sulfhydryl Groups in Striatum and Thalamus of Rat. *Biol. Trace Element Res.* **77**, 251-259.
- Zieglgansberger W. and Puil E. A. (1973) Actions of glutamic acid on spinal neurons. *Exp. Brain Res.* **17**, 35-49.

ANEXO A

a) ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (HD) fue descrita en 1872 por George Huntington, médico de Pomeroy, Ohio, en un documento que leyó ante la Meigs y Mason Academy of Medicine, y que se publicó más tarde en el *Medical & Surgical Reporter* de Filadelfia. Huntington ofreció una descripción sucinta y gráfica de la enfermedad que basó en las observaciones de los pacientes que su padre y su abuelo habían atendido durante su ejercicio profesional en East Hampton, Long Island. Habían aparecido con anterioridad algunos informes (consultar la referencia de DeJong (1973) para antecedentes históricos), pero las descripciones carecían de la precisión y la integridad que caracterizaron a la enfermedad de Huntington. Vessie, en 1932, pudo demostrar que prácticamente todos los pacientes de la porción oriental de los E.U. que experimentaban esta enfermedad podrían rastrear, hasta que logró encontrar entre sus antecesores a cerca de seis individuos que habían emigrado en 1630 desde la minúscula aldea del este de Bures, en Suffolk, Inglaterra. Se rastrearon los casos de una familia notable durante cerca de 300 años a través de 12 generaciones, en cada una de las cuales se había expresado esta enfermedad y evidenciando desde un principio su carácter hereditario (Adams y cols, 1999).

Según Huntington, la regla general había sido que "...cuando uno o ambos padres han expresado manifestaciones de la enfermedad, la sufrirán invariablemente uno o más de sus descendientes, si viven hasta la vida adulta. Pero si por cualquier motivo éstos niños pasan por la vida sin ella, se rompe el hilo y los nietos y los bisnietos de los pacientes originales pueden estar tranquilos por que se encuentran libres de la enfermedad..." (Adams y cols. 1999).

Davenport, en 1915, en una revisión de 962 pacientes con la enfermedad, encontró sólo cinco que eran descendientes de padres no afectados. Posiblemente en estos últimos pacientes uno de los padres tenía el rasgo, pero en forma moderada. Es más probable que estos pacientes representaran casos esporádicos de HD; es decir, casos en los que la

mutación había ocurrido a partir de un gen normal hasta la forma mutante productora de la enfermedad (Adams y cols., 1999).

La HD se encuentra dispersa por todo el mundo, aún en los lugares más remotos, y ocurre con una prevalencia de entre 5 y 10 casos por cada 100,000 (Coneally, 1984). Interesantemente, la HD puede ocurrir en número más grande, saliéndose de la estadística promedio, en algunos lugares específicos. Por ejemplo, la prevalencia de HD puede exceder de 100 casos por cada 100,000 en Lago de Maracaibo, Venezuela. En E.U., alrededor de 25,000 personas sufren de HD y 125,000 individuos están en riesgo de expresar la enfermedad (datos hasta 1997) (Adams y cols., 1999).

De 3 a 5 % de los casos se inician antes de los 15 años de edad y algunos lo hacen incluso en la infancia. En 28 % de los casos los síntomas se ponen de manifiesto después de los 50 años de edad y el resto esta entre los 35 y 45 años de edad. El progreso de la enfermedad es más lento en los pacientes ancianos que en los jóvenes. Una vez iniciada la enfermedad progresa de manera irreversible y sobreviene alguna complicación que termina con la vida del paciente (Adams y cols., 1999).

La comprobación genealógica exhaustiva ha establecido que la causa de HD es un gen autosómico dominante monohíbrido con penetrancia completa. Existe la hipótesis de que los pacientes jóvenes suelen heredar la enfermedad de sus padres, y los ancianos lo heredan de sus madres (Martin, 1984). Se ha llegado a observar la HD incluso en cuatro grupos de gemelos idénticos con iniciación casi a la misma edad (Adams y cols., 1999).

Hasta hace algunos años no era posible pronosticar la expresión de la enfermedad en los hijos de los pacientes afectados. El metabolismo de la glucosa en el núcleo caudado, que se mide mediante tomografía de emisión de positrones (PET), aunque reducido en la mayoría de los pacientes presintomáticos, no es un medio totalmente confiable para identificar a las personas en riesgo de desarrollar la enfermedad. El logro más importante con respecto a la identificación presintomática de la HD fue el descubrimiento de Gusella y cols. (1983) de un marcador relacionado con la enfermedad, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, específicamente en el locus IT15 (Kordower y cols., 1999). Estos investigadores, y otros más, identificaron la anomalía genética y encontraron que era un codón repetido (CAG) de cuya longitud de repeticiones depende la edad de inicio (anticipación) (The Huntington Disease Research Collaborative Group, 1993). Este descubrimiento ha hecho posible desarrollar una prueba para identificar al gen defectuoso

en individuos asintomáticos. Sin embargo, en consideración a que la enfermedad es incurable, esta prueba plantea problemas éticos para aplicarlo de manera generalizada (Martín, 1984).

La HD también es conocida por sus características clínicas como "corea de Huntington". El término corea viene del latín "*Choreia*" que significa "danza", es decir que la enfermedad involucra desórdenes del movimiento de tipo coreico (ver más adelante). Sin embargo, éstos no comienzan sino hasta avanzado el padecimiento, ya que la enfermedad inicia con ligeros trastornos en la conducta, cambios psiquiátricos seguidos de la corea, y que evolucionan hasta la demencia (Shoulson, 1984).

El inicio de la enfermedad presenta alteraciones psiquiátricas. El *trastorno mental* adopta varias formas sutiles mucho antes que se ponga de manifiesto el deterioro de las funciones cognoscitivas. En cerca de la mitad de los casos, los primeros síntomas en aparecer son alteraciones ligeras, y a menudo desconcertantes del carácter. Los pacientes empiezan a encontrar todo mal, a quejarse constantemente y a sermonear a otros miembros de la familia; pueden ser desconfiados, irritables, impulsivos, excéntricos, desaseados o excesivamente religiosos, o manifiestan un sentido falso de la realidad (Adams y cols., 1999). El descontrol de sí mismo puede reflejarse en explosiones de carácter, desaliento, alcoholismo o promiscuidad sexual. Estos trastornos emocionales y los cambios de la personalidad pueden alcanzar proporciones suficientes para poderse calificar virtualmente como psicosis (delirios o alucinaciones de persecución); son frecuentes los trastornos del humor, en particular la depresión (casi la mitad de los pacientes en algunas series), y pueden constituir los síntomas más prominentes al principio del padecimiento. Es invariable que, tarde o temprano, el intelecto empiece a fallar. El paciente se vuelve menos comunicativo y más aislado desde el punto de vista social. Pueden precipitar la consulta médica la disminución del rendimiento en el trabajo, incapacidad para hacer frente a las responsabilidades del hogar y trastornos del sueño. Hay además dificultades para conservar la atención, la concentración y la asimilación de nuevo material. La flexibilidad mental disminuye. Hay pérdida de las habilidades manuales finas. Las partes de rendimiento de la escala de inteligencia Wechsler del adulto (mayor detalle ver bibliografía), ponen de manifiesto una pérdida mayor que las partes verbales. La memoria está relativamente indemne. Esta pérdida gradual de la función intelectual se ha caracterizado como "*Demencia Subcortical*", es decir, se observan sólo rara vez

elementos de *Afasia* (trastorno del lenguaje que puede presentarse en diversas formas y que debe distinguirse de las alteraciones funcionales de los órganos ejecutivos de la fonación –motricidad de la articulación– conocida como *Disartria*), *Agnosia* (trastorno a causa de un defecto somatosensitivo) y *Apraxia* (trastorno de la ordenación secuencial de movimientos singulares para realizar otros combinados o maniobras, pero conservando la movilidad elemental). A menudo el proceso es tan lento que se conserva cierto grado de capacidad funcional durante muchos años (Adams y cols., 1999).

La anormalidad de los movimientos es al principio ligera, y abarca a las manos y a la cara; el paciente se considera a sí mismo inquieto o "nervioso". Los signos tempranos son lentitud de los movimientos de los dedos y las manos, tasa reducida de golpeteo con los dedos y dificultades para efectuar una sucesión de movimientos con las manos. Gradualmente, estas anomalías se van volviendo más pronunciadas hasta que se afecta toda la musculatura. Aumenta la frecuencia del parpadeo (lo contrario a lo que ocurre en el parkinsonismo), se tiene un control deficiente de la lengua (no puede conservarse la lengua fuera de la boca) y también del diafragma. En la etapa avanzada de la enfermedad el paciente está quieto rara vez, más de unos cuantos segundos. Los movimientos son más lentos que las sacudidas bruscas y los lapsos posturales de la corea de Sydenham, y abarcan a muchos más músculos. Tienen a reaparecer en patrones estereotipados, pero no tanto como los tics. En los casos más avanzados adquieren una cualidad atetoide o distónica (hiperquinesias perezosas involuntarias sobre todo en los segmentos distales de las extremidades). El tono muscular suele estar disminuido hasta la parte tardía de la enfermedad, en la cual puede haber cierto grado de rigidez, temblor y bradicinesia (término que indica lentitud, más que falta de los movimientos). Los reflejos tendinosos están intensificados en una parte de los pacientes, pero sólo unos cuantos tienen signo de Babinski (prueba de reflejo tendinoso que evoca una de las reacciones reflejas al estimular la planta del pie). En los individuos sanos, la fricción del borde externo del pie desencadena una flexión plantar tónica de los dedos. Los movimientos voluntarios se inician y ejecutan con más lentitud que en condiciones normales, pero no hay debilidad ni *ataxia real* (trastorno de la marcha); la ataxia sensitiva se debe a la posición de las articulaciones en un sentido muscular debido a la interrupción de las fibras nerviosas aferentes en los nervios periféricos, las raíces posteriores, lesión de ambos lóbulos parietales, etc., y cuyo efecto priva al paciente de la percepción de la posición que tiene

su extremidad, con sentido de desequilibrio. Cuando se suspende en el espacio a un paciente de Huntington, las extremidades superiores adoptan una postura en flexión y las piernas en extensión, lo que se considera expresivo del síndrome estriatal (Denny y Brown, 1962). Se encuentra trastornada también la función oculomotora en la mayoría de los pacientes (Leigh y cols., 1983; Lasker y cols., 1987).

La relación de los síntomas coreícos con los mentales "no se rige por una regla general" (Wilson, 1940). Más a menudo, los síntomas mentales preceden a la corea, pero pueden acompañar a la iniciación de ésta u ocurrir después de ella, en ocasiones por muchos años de diferencia. Incluso hay datos en los que el trastorno de los movimientos existió durante 10 a 30 años sin cambios mentales en los pacientes con la anomalía génica de la HD (Britton y cols., 1995). Después de 10 a 15 años, la mayoría de los pacientes se deterioran hasta llegar a un estado vegetativo, incapaces de adoptar la bipedación además de comer poco, hasta que sobreviene una neumonía (o alguna otra complicación inherente del padecimiento) que terminan con su vida. En esta etapa final puede aparecer amiotrofia. Es notable la tasa elevada de suicidios en los pacientes con HD (Shoenfeld y cols, 1984), o como señaló el mismo Huntington, hay una incidencia elevada de traumatismos; el hematoma subdural crónico es un hallazgo frecuente durante la necropsia (Adams y cols., 1999).

Los primeros signos de la enfermedad pueden aparecer durante la infancia, antes de la pubertad (incluso antes de los cuatro años de edad), y se han descrito varias series de éstos casos (Farrer y Coneally, 1987; Van Dijk y Van Der Velde, 1986). El deterioro mental a esta edad temprana se acompaña más a menudo de *ataxia cerebelosa*, problemas de conducta, convulsiones, *bradicinesia*, rigidez y *distonia*, que de la misma corea (Byers y cols., 1973); sin embargo, la forma rígida de la enfermedad (variante de Westphal) ocurre también en adultos. La declinación funcional es mucho más rápida en los niños que en los adultos (Young y cols., 1986).

La iniciación más temprana en las generaciones sucesivas (*anticipación*) se define adecuadamente desde los inicios del estudio. Chandler y cols. (1960) demostraron que la demencia es en general más grave en los casos de iniciación temprana (15 a 40 años) que los casos tardíos (55 a 60). Como ya se mencionó, los casos de iniciación temprana son los que tienen las repeticiones de CAG más prolongadas. Más aún, en los pacientes adultos con iniciación temprana de la enfermedad, el trastorno emocional tiende a ser

prominente al principio, y precede a la corea y a la pérdida intelectual por muchos años. En el caso de la iniciación tardía, los movimientos coreiformes y la demencia progresiva son más a menudo los componentes iniciales y tienen su principio casi a la misma edad. (Adams y cols., 1999).

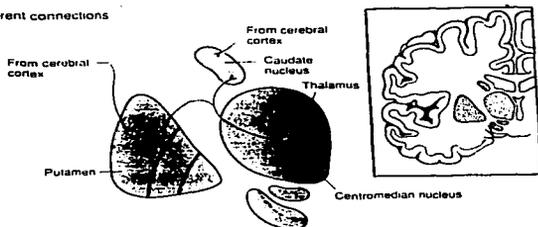
b) ↪ TRANSMISION EXCITATORIA ↩

i) CUERPO ESTRIADO

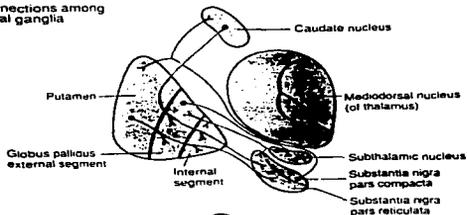
Los ganglios basales carecen de definición precisa como entidad anatómica. Las estructuras principales que los constituyen son el núcleo caudado y el núcleo lenticular con sus dos subdivisiones, el *putamen* y el *globus pallidus* (globo pálido). Dado que el núcleo caudado y el putamen son, en realidad, una estructura continua (separada sólo de manera incompleta por fibras de la cápsula interna) y son diferentes desde los puntos de vista citológico y funcional del globo pálido, una división más significativa de estas agregaciones nucleares sería: *cuerpo estriado* o *neostriatum*, constituido por el núcleo caudado y el putamen, y cuerpo pallidum, que tiene segmentos medial (interno) y lateral (externo). El putamen y globo pálido se encuentran en la superficie lateral de la cápsula interna que los separa del núcleo caudado, el tálamo, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra sobre su lado medial (Kiernan, 2000).

En virtud de sus conexiones estrechas con los núcleos caudado y lenticular, el núcleo subtalámico (núcleo de Luys) y la sustancia nigra suelen considerarse partes de los ganglios basales. Algunos fisiólogos han ampliado la lista de las estructuras ganglionares basales para incluir al núcleo rojo, núcleos talámicos intraluminales y formaciones reticulares de la parte alta del tallo cerebral. Las últimas estructuras reciben proyecciones corticales directas y originan los fascículos rubroespinal y reticuloespinal. Estos fascículos corren paralelos a los corticoespinales (piramidales) y se designaron como extrapiramidales. Sin embargo, estos enlaces no piramidales son estructuralmente independientes de otro circuito que incluye al cuerpo estriado, globo pálido, tálamo y cortezas premotora y motora complementaria. Dado que estas últimas áreas corticales

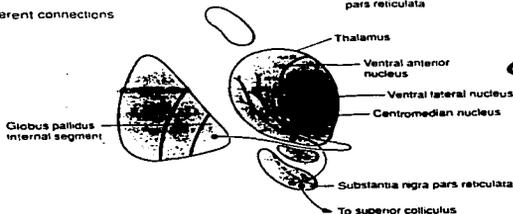
A Afferent connections



B Connections among basal ganglia



C Efferent connections



Major anatomical connections of the basal ganglia.
A. The caudate nucleus and putamen receive almost all afferent input to the basal ganglia.
B. The internuclear connections include topographically organized connections between all of the nuclei of the basal ganglia.
C. The principal target of efferent connections from the basal ganglia is the thalamus.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 2a Conexiones de Ganglios Basales (Kandel y cols., 1991).

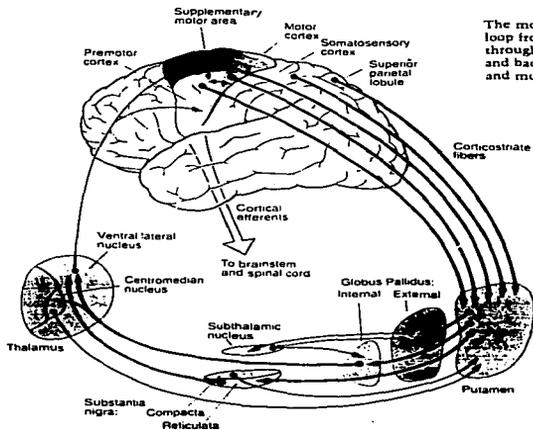
se proyectan hacia la corteza motora, este circuito se designa con mayor corrección como prepiramidal (Thach y Montgomery, 1992). Se han postulado también otros circuitos: uno que conecta a la corteza prefrontal, núcleo caudado y núcleo accumbens, y otro que conecta al sistema límbico y al núcleo caudado, así como a otras estructuras (Alexander y cols., 1992).

ii) CIRCUITERIA ESTRIATAL

El estriado como parte receptiva del ganglio basal, recibe topográficamente fibras organizadas de todas partes de la corteza cerebral. Las bases para las funciones motoras de los ganglios basales se ilustran en la Figura 4. Estas porciones de la corteza cerebral están relacionadas muy estrechamente para el control de los movimientos (área motora suplementaria, corteza premotora, corteza motora, corteza somatosensorial, y el lóbulo parietal superior) y hacen proyecciones densas organizadas topográficamente hacia la porción motora del putamen. El circuito de salida de este camino, nombrado *circuito motor* del ganglio basal, inicialmente es dirigido hacia el área motora suplementaria y corteza premotora (Adams y cols., 1999).

La actividad de algunas neuronas está relacionada con movimientos discretos y direccionalmente pasivo-selectivos y activos de partes individuales del cuerpo, usualmente movimientos de una articulación individual. La actividad de las neuronas en el putamen difiere de aquellas neuronas en la corteza y área motora suplementaria en algunos caminos. Primero, en respuesta a las tareas guiadas visualmente, las células en los ganglios basales son selectivas para movimientos de encendido más lento de aquellas células en las áreas motoras corticales. Segundo, las neuronas en el putamen están más comúnmente orientadas a ser selectivas en la dirección de movimientos límbicos que para la activación de músculos específicos. Estas características indican que los ganglios basales no juegan un papel significativo en la iniciación de movimientos estímulo-accionados y no directamente específicos de las fuerzas musculares necesarias para la ejecución de movimientos (Kandel y cols., 1991).

Una característica importante de la estructura y función ganglionar basal, sólo apreciada "recientemente", es la no-equivalencia de todas las partes del estriado. Tipos de célula particulares parecen tener diferentes funciones receptoras y de ejecución. Albin y colaboradores (1989) han propuesto que las proyecciones estriatales surgen de diferentes



The motor circuit of the basal ganglia is a subcortical feedback loop from the motor and somatosensory areas of the cortex, through restricted portions of the basal ganglia and thalamus, and back to the premotor cortex, supplementary motor area, and motor cortex.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2b Conexiones de Ganglios Basales (Kandel y cols., 1991).

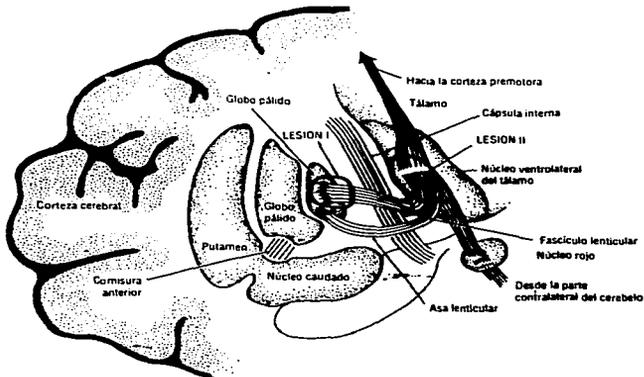


Fig. 3 Ubicación del estriado en el cerebro (Adams y cols. 1999)

subpoblaciones neuronales mediante diferentes aspectos del control motor. Dos sistemas mayores de fibras estriatopálidas han sido propuestos: 1) Un paso directo estriato-medial pálido-nigral (parte reticulada), el cual es activado por proyecciones glutamatérgicas de la corteza motora-sensitiva y por proyecciones nigrales dopaminérgicas (parte compacta-estriatal). La estimulación de este paso directo inhibe el pallidum medial, el cual, en turno, desinhibe el núcleo ventrolateral y ventroanterior del tálamo, y como consecuencia, la conducción talamocortical es incrementada y los movimientos iniciados corticalmente son facilitados; 2) Un circuito indirecto estriatal-subtalámico pálido medial-nigral. Éste, en contraste a la acción excitatoria del paso directo, utiliza un mediador dopaminérgico el cual es inhibitorio. Estas proyecciones estriatales tienen un efecto inhibitor en el pálido lateral el cual, en turno, inhibe al núcleo subtalámico, dirigiéndose al pálido medio y parte reticulada de la sustancia nigra. El efecto neto es reducir la inhibición palidal del tálamo, incrementando otra vez la conducción talámica a la corteza premotora (Adams y cols., 1999).

En resumen, las entradas corticales al neostriado son excitatorias y mediadas por neuronas glutamatérgicas; el camino directo a través de los ganglios basales es la proyección estriatal hacia el segmento interno del globo pálido y parte reticulada de la sustancia nigra (el núcleo de salida de los ganglios basales), el cual entonces proyecta al tálamo. El paso indirecto es del circuito del neostriado al segmento externo del globo pálido, el cual proyecta al núcleo subtalámico. El núcleo subtalámico en turno, proyecta hacia ambos segmentos del pálido y la sustancia nigra (Kandel y cols., 1991). Así, las sustancias neurotransmisoras más importantes, desde el punto de vista de función ganglionar basal, son el glutamato, el GABA, la dopamina, la acetilcolina y la serotonina. De ellas, el glutamato es el neurotransmisor de las proyecciones corticoestriatales excitatorias y de las neuronas excitatorias del núcleo subtalámico, mientras que el GABA es el neurotransmisor inhibitor de las neuronas estriatales de proyección del globo pálido y de la parte reticulada de la sustancia nigra. Las proyecciones nigroestriatales, derivadas de neuronas de la parte compacta utilizan dopamina como su neurotransmisor. La acetilcolina (ACh), neurotransmisor de la unión neuromuscular, lo mismo que de los ganglios autónomos o vegetativos, es activa desde el punto de vista fisiológico en los ganglios basales, y el cuerpo estriado contiene la concentración más elevada de este neurotransmisor, así como de las enzimas necesarias para su síntesis. Las grandes

neuronas neostriatales (del tipo 2 de Golgi) sintetizan y descargan a la acetilcolina, que tiene sobre ellas un efecto excitatorio, mientras que la dopamina tiene un efecto inhibitorio de estas neuronas. Respecto a la noradrenalina, se encuentran concentraciones relativamente bajas en ganglios basales, y su función como neurotransmisor no está aún muy clara. Los ganglios basales contienen además otras sustancias biológicamente activas, tales como los neuromoduladores, entre los que se encuentran la sustancia P, la encefalina, la colecistoquinina, la somatostatina y el neuropéptido Y, los cuales pueden intensificar o disminuir los efectos de los otros neurotransmisores (Kandel y cols., 1991).

El camino directo del estriado al núcleo del circuito de salida es regulado por GABA y sustancia P. Este paso es inhibitorio, así como el paso del núcleo del circuito de salida al tálamo, mediado también por GABA. Los movimientos resultan cuando las células talámicas son liberadas de la inhibición tónica y ésto ocurre cuando la entrada corticoestriatal excita las neuronas estriatales, lo cual resulta en desinhibición fásica, una inhibición de células inhibitorias en el núcleo del circuito de salida de los ganglios basales. La activación resultante de las neuronas tálamocorticales es a través de movimientos faciales por áreas premotora y motora suplementarias, activando así su proyección hacia la corteza motora, el tallo cerebral, y la médula espinal (Kandel y cols., 1991).

El camino indirecto de los ganglios basales opera de manera distinta. La excitación corticoestriatal resulta en la inhibición del segmento externo del pálido mediada por GABA y encefalina, y la desinhibición del núcleo subtalámico mediada por GABA, la cual excita al núcleo de salida, paso mediado por el glutamato. Esto inhibe al tálamo y disminuye la excitación del área motora suplementaria. La proyección dopaminérgica de la sustancia nigra tiene algunos efectos en neuronas en el neostriatum. La dopamina excita neuronas estriatales que liberan GABA y sustancia P, y proyectan hacia el núcleo de salida. Por el contrario, la dopamina inhibe el paso indirecto de las neuronas estriatales que liberan GABA y encefalina hacia el segmento externo del pálido. Ya que el paso directo parece facilitar movimientos por excitación del área motora suplementaria, el paso indirecto tiene el efecto opuesto: la dopamina parece facilitar movimientos por acción en ambos pasos (Kandel y cols., 1991).

Las enfermedades de los ganglios basales producen, en forma característica, movimientos involuntarios. Estos incluyen temblores (movimientos oscilatorios, involuntarios y rítmicos), atonosis (movimientos lentos de escritura en dedos y manos, y

algunas veces en la punta de los pies), corea (movimientos abruptos de los músculos facial y de miembros), balismo (movimientos espasmódicos oscilantes anormales) y distonía (postura persistente de una parte del cuerpo la cual puede resultar en movimientos grotescos y posición distorsionada del cuerpo). Estos síntomas pueden frecuentemente ocurrir juntos y pueden tener bases en común. En la corea crónica del tipo de Huntington existe una correlación clinicopatológica localizada en núcleo caudado y putamen dentro de los trastornos motores extrapiramidales (Adams y cols., 1999).

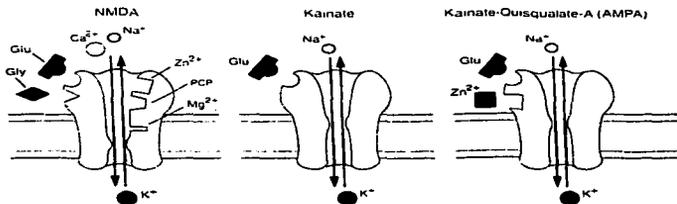
iii) RECEPTORES TIPO NMDA

Estudios farmacológicos realizados por Watkins y Evans (1981) permitieron el conocimiento de que el glutamato, además de enlazarse a otros tipos de receptores, se enlaza a un sitio receptor particular dentro de los canales iónicos regulados por él mismo, el cual es conocido como receptor tipo NMDA; ésto debido a que se activan selectivamente por un agonista exógeno del glutamato, el N-metil-D-aspartato (NMDA) (Kandel y cols., 1991).

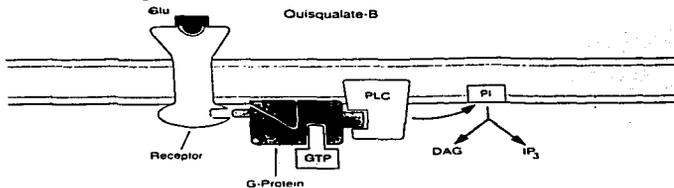
El complejo receptor-canal para NMDA tiene dos propiedades excepcionales: la primera es que el receptor controla un canal catiónico de alta conductancia que es permeable a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , y la segunda propiedad es que el canal es bloqueado por Mg^{2+} extracelular al potencial de membrana de reposo (-65 mV); el canal no conduce iones eficientemente cuando es activado sólo por glutamato y la despolarización de membrana no es sostenida; ésto es, que el bloqueo del Mg^{2+} es dependiente del voltaje. La despolarización adecuada de la membrana (por 20 a 30 mV) conduce al Mg^{2+} fuera del canal, permitiendo entrar Na^+ y Ca^{2+} a la célula si el glutamato está presente. El flujo de Ca^{2+} activa la corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} que repolariza la membrana y restaura el canal bloqueado por Mg^{2+} . Además, el canal sólo funciona eficientemente en presencia de glicina. Cuando la concentración de glicina es reducida, la capacidad del glutamato para abrir el canal es mayormente reducida (Adams y cols., 1999).

Resumiendo, los canales-receptores tipo NMDA están regulados en forma doble, abriéndose sólo cuando se satisfacen principal y simultáneamente dos condiciones: 1) el neurotransmisor glutamato debe estar unido al receptor, y 2) la membrana debe estar intensamente despolarizada. La segunda condición es necesaria para liberar Mg^{2+} . Los receptores tipo NMDA son críticos para la potenciación a largo plazo (LTP). Cuando se

A Directly gated receptors



B Second-messenger linked receptor



Four classes of glutamate receptors regulate excitatory synaptic actions in motor and other neurons in the brain.

A. The NMDA receptor regulates a channel permeable to Ca^{2+} , K^+ , and Na^+ , and has several binding sites for glycine, Zn^{2+} , PCP, MK801 (an experimental drug), and Mg^{2+} , which regulate the functioning of this channel in different ways. The kainate receptor binds the glutamate agonist kainate and regulates a channel permeable to Na^+ and K^+ . Kainate quisqualate-A re-

ceptor also binds AMPA and regulates a Na^+ - K^+ channel very similar to the kainate-activated receptor-channel. It, too, has a binding site for Zn^{2+} .

B. The quisqualate-B receptor stimulates the activity of phospholipase C (PLC) leading to the formation of the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG) from phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2).

Fig. 4 Canales ionotrópicos y metabotrópicos (Kandel y cols., 1991)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

bloquean selectivamente mediante un inhibidor específico, la LTP no aparece, aunque la transmisión sináptica que abre canales catiónicos continúa regularmente (Alberts y cols., 2002).

El receptor NMDA puede distinguirse farmacológicamente de los receptores a kainato y quisqualato (otros receptores glutamatérgicos ionotrópicos), bloqueándolo selectivamente con 2-amino-5-fosfonovalerato, o inhibiéndolo por fenciclidina (o "polvo de ángel").

iii) GLUTAMATO

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor de tipo excitatorio del *sistema nervioso central* (Zieglgansberger y Puil, 1973; Hablitz y Langmöen, 1982), aunque existen otros agentes excitadores como la acetilcolina y la serotonina), tanto en el *hipocampo*, como en otras regiones. El Glu puede generar un influxo de Na^+ y despolarizar la membrana postsináptica hacia el potencial de umbral y disparar el potencial de acción. Los canales iónicos regulados por Glu están formados por subunidades polipeptídicas homólogas las cuales tienen una forma pentamérica semejante al receptor de acetilcolina, codificadas por genes diferentes o generadas por la maduración alternativa del RNA del mismo producto génico (Adams y cols., 1999).

El Glu existe virtualmente en todas las neuronas centrales y está presente en las terminales nerviosas en concentraciones extremadamente elevadas (10^{-3} M). En la transmisión sináptica normal, el nivel de Glu elevado en el espacio sináptico es restringido y transitorio. En contraste, incrementos difusos y sostenidos de Glu matan a las neuronas (Alberts y cols., 2002).

El Glu es un producto del ciclo de Krebs y en las neuronas se encuentra compartimentalizado, manejándose así como transmisor y diferenciándose del Glu metabólico. Si se encontrara en el citoplasma libremente, el Glu podría ser vulnerable a degradación enzimática intracelular (Kandel y cols., 1991). Los transportadores situados en las terminales presinápticas secuestran Glu directamente del espacio sináptico. De manera coordinada, los transportadores situados en células gliales mantiene una baja concentración extracelular de Glu, favoreciendo el gradiente de difusión para su salida al espacio sináptico (Kandel y cols., 1991).

Hay cuatro tipos de receptores glutamatérgicos, aunque la mayor acción excitatoria de glutamato en neuronas motoras es producida por su enlace a dos tipos específicos de receptores, los receptores a kainato y a quisqualato A; ambos activan directamente una baja conductancia del canal permeable a Na^+ y K^+ . Los receptores quisqualato B activan en forma indirecta canales Na^+ y K^+ , activando un sistema de segundo mensajero ligado a fosfoinosítido (Kandel y cols., 1991).

Las cantidades excesivas de Glu son altamente tóxicas para las neuronas. Siendo el Glu el mayor transmisor excitatorio en el cerebro, casi todas las células en el cerebro tienen receptores que responden a éste. En cultivos de tejido, sin embargo, una breve exposición a altas concentraciones de glutamato podría matar muchas neuronas. La toxicidad del glutamato puede deberse en parte al flujo excesivo de Ca^{2+} a través de los canales activados por NMDA. Altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular pueden activar proteasas dependientes de Ca^{2+} y a su vez, producir radicales libres que son tóxicos para la célula; además el Ca^{2+} activa fosfolipasa A_2 , la cual libera ácido araquidónico, lo que tienen como consecuencia la producción de agentes pro-inflamatorios (leucotrienos entre otros) y radicales libres que pueden activar otros eventos nocivos (Alberts y cols., 2002).

Los eventos más importantes que llevan a la acumulación de Glu son explicados por: (1) inhibición del empleo de Glu como sustrato oxidativo, (2) estimulación de la síntesis de Glu debido a la disponibilidad incrementada de amonio, y (3) incremento en el contenido de Glu debido al importante decaimiento de la glutamina. Adicional a la falla en la síntesis de proteínas por falta de ATP, la concentración de proteínas de citoesqueleto es disminuida por varias proteasas activadas por el alto contenido de calcio citosólico, por ejemplo, la calpaina, quien degrada proteínas de mielina, así como proteínas de microtúbulo y neurofilamento. La tubulina y la nucleótidofosfodiesterasa cíclica son degradadas por otras proteasas (Alberts y cols., 2002). Así, los cambios tóxicos producidos por Glu son causa de daño y muerte celular siguiendo efectos agudos cerebrales, así como apoplejía o convulsiones. En suma, la excitotoxicidad puede contribuir a enfermedades crónico-degenerativas en el cerebro.

c)

TRANSMISION INHIBITORIA

i) ÁCIDO GAMMA-AMINO BUTÍRICO

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el mayor neurotransmisor inhibidor del SNC (Lloyd y Morselli, 1983; Enna, 1985; Schwarcz, 1988) y se encuentra ampliamente distribuido en todo el SNC de mamíferos, encontrándose en altas concentraciones particularmente en núcleos de ganglios basales, incluyendo caudado y putamen, globo pálido y sustancia nigra (Gale y Casu, 1981). Se ha estimado que el GABA está presente en 60-70% de todas las sinapsis en el SNC (Fahn, 1976). Se argumenta que la transmisión GABAérgica a un sitio puede en turno disminuir la actividad GABAérgica en otro en el mismo circuito. Sin embargo, el papel del GABA puede ser más bien definido en base a su sitio anatómico de ubicación (Gale y Casu, 1981). El GABA puede actuar como transmisor en algunas neuronas pero no en otras.

Una reducción en la actividad neuronal GABAérgica ha sido implicada en la etiología de una variedad de desórdenes neurológicos. Dentro del complejo circuito en el que las neuronas GABAérgicas se encuentran embebidas, un cambio en su actividad funcional puede ser modificada por una variedad de fármacos o lesiones, los cuales no afectan directamente las neuronas GABAérgicas. Sin embargo, un cambio en la transmisión de una unión sináptica puede causar cambios secundarios que ocurran en sinapsis subsecuentes en el mismo circuito neural. Tanto la colina-acetil transferasa (la enzima requerida para la formación de acetilcolina), como la glutamato descarboxilasa (enzima requerida para sintetizar GABA) son marcadamente disminuidas en el estriado de pacientes con la enfermedad de Huntington (HD). Este déficit de enzimas es consistente con la observación clínica respecto al empeoramiento de los movimientos coreicos en pacientes con HD con una administración continua de L-DOPA (Gale y Casu, 1981).

ii) METABOLISMO DEL GABA

El GABA es sintetizado en terminales nerviosas por transaminación de α -cetoglutarato a ácido L-glutámico, el cual es entonces descarboxilado (en el 1-carboxilo) por la glutamato descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés) para dar como resultado GABA. Una vez dentro de las terminales nerviosas presinápticas, el GABA puede ser re-

liberado en futuras despolarizaciones, o bien ser catabolizado por la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-T), la cual transfiere el grupo amino del GABA formando al α -cetoglutarato, y de este modo obtener glutamato y semialdehído succínico. La liberación presináptica de GABA ocurre a través de un mecanismo dependiente de calcio, el cual es regulado por autoreceptores presinápticos (Bowery, 1993). Encontrándose dentro de células gliales, el GABA es catabolizado por GABA-aminotransferasa a semialdehído succínico; éste último es, más adelante, catabolizado a ácido succínico por la succinato-semialdehído deshidrogenasa, y es así como el succinato entra al ciclo de Krebs (Tapia, 1983; Suzdak y Jansen, 1995). Cuando el GABA es liberado en la sinapsis, puede unirse al complejo receptor GABA-A postsináptico o al receptor GABA-B. El receptor GABA-B es un receptor acoplado a proteína G. Cuando el GABA activa receptores GABA-B produce hiperpolarización e inhibición de liberación de neurotransmisores. La activación por GABA del complejo de canales de iones cloruro acoplados a receptores GABA-A resulta en una conductancia incrementada de cloruro hacia el interior, provocando una hiperpolarización de la membrana e inhibición neuronal (Leidenheimer y col., 1991; Luddens y Wisden, 1991; Vincini, 1991).

Ya que la enzima GABA-aminotransferasa es mitocondrial, la terminación de la acción sináptica de GABA no es por una ruptura enzimática; parece ser que ocurre a través de una recolección Na^+ y Cl^- dependiente del aminoácido dentro de terminales nerviosas o de células gliales (Tapia, 1983). Otros autores sugieren que el GABA puede ser removido de la sinapsis, ya sea por una gran afinidad transportadora de GABA dependiente de Na^+ hacia el interior de células neuronales o gliales, o bien, por difusión de la sinapsis (Krogsgaard-Larsen, 1988; Schousboe y cols., 1991). Tales mecanismos incluyen la posibilidad de que la energía para el transporte sea obtenida del gradiente de concentración del sodio y del gradiente eléctrico de la membrana, pero otro factor que juega un papel importante es la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ electrogénica. El análisis en sinaptosomas indica la participación de dos o tres iones de Na^+ por molécula de GABA transportada (Martin, 1976); sin embargo, estudios cinéticos soportan que es una acoplación de por lo menos dos Na^+ por una molécula de GABA (Blaustein y King, 1976; Roskoski, 1981). Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, que el GABA tiene un bajo grado de liberación espontánea y que su liberación es estimulada por condiciones de despolarización en una forma calcio-dependiente (Tapia, 19833).

iii) RECEPTORES

Los canales activados por glutamato, GABA y glicina, como los canales catiónicos activados por acetilcolina (Ach), están formados cada uno por una subunidad múltiple protéica transmembranal que consiste tanto de un poro conductor embebido en la membrana celular, como de un sitio enlazante transmisor en la cara externa de la membrana. Los diferentes sitios regulatorios de los canales a GABA están localizados en diferentes subunidades, contenidos en receptores NMDA. El canal receptor homooligomérico ensamblado de esta única subunidad es regulado por glicina y conductos de Ca^{2+} , y es inhibido por Zn^{2+} y bloqueado en una forma dependiente de voltaje por Mg^{2+} .

El análisis de la estructura primaria del receptor GABA indica una composición de al menos tres subunidades $-\alpha$, $-\beta$ y $-\gamma$. Todas las subunidades enlazan GABA, aunque la subunidad α de este modo es la de menor afinidad. Ambas subunidades α y β enlazan barbitúricos, pero sólo la subunidad γ enlaza benzodiazepinas. Tanto las benzodiazepinas como los barbituratos actúan incrementando el flujo de Cl^- inducido por GABA. La presencia de alguno de los tres ligandos-GABA, benzodiazepinas o barbitúricos- influencia el enlace de los otros dos (Tapia, 1983).

Los tres canales iónicos activados por los transmisores anteriormente mencionados son codificados cada uno por una familia de genes separada. La familia transmisor-iniciada de canales iónicos puede ser catión-selectiva (excitadora) o anión-selectiva (inhibitoria). Ambos tipos están hechos de algunos péptidos. Estos péptidos o subunidades tienen todos cuatro segmentos atravesando la membrana, uno de los cuales, la región M2, está a través de la línea del poro. Cuando el segmento M2 es flanqueado por un grupo de aminoácidos ácidos (por ejemplo, aspartato o glutamato), el canal es selectivo para cationes. Cuando el segmento M2 tiene grupos de residuos básicos, el canal es selectivo para aniones (Tapia, 1983).

ANEXO B

a)

↻ ESTRÉS OXIDATIVO ↻

i) RADICALES LIBRES

Un radical libre (RL) ha sido definido como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, y que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical:

$X \rightarrow e^- + X^{\bullet}$ Radical formado por la pérdida de un electrón de un no radical

$Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet}$ Radical formado por la ganancia de un electrón de un no radical

(Halliwell y Gutteridge, 1989).

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula, y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente "no radical". Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable (Zentella y Saldaña, 1996), mientras que por otra parte, en términos de daño biológico, *Reactividad* no es lo mismo que *Toxicidad* (McCord, 1992).

Las principales funciones de los RL en sistemas biológicos son: como promotores de especies ferrilo, oxidación del etanol por RL, reducción de ribonucleótidos, reacciones de oxidación, carboxilación e hidroxilación, fagocitosis, actividad de peroxidasa y NADH oxidasa, maduración y respuesta al daño en tejidos vegetales, producción de eicosanoides, etc. Por ejemplo, los linfocitos y los fibroblastos constantemente generan pequeñas cantidades de radicales superóxido como reguladores de crecimiento. Los RL también están presentes para la regulación controlada de los mecanismos celulares normales y el control de reacciones enzimáticas (por ejemplo, ribonucleósido difosfato reductasa, citocromo P-450 y ciclo-oxigenasa), o bien, pueden ser productos de reacciones catalizadas enzimáticamente (tales como las catalizadas por la xantina oxidasa) (Hallywell y Gutteridge, 1989; Hallywell y Cross, 1994). Los RL están involucrados también en el sistema inmune a través de los fagocitos en el llamado "estallido respiratorio", donde la oxidasa inicia el mecanismo de defensa (Babior, 1994; Allen, 1994), o bien, en las plantas,

participando en procesos como la maduración, el envejecimiento y la respuesta al daño tisular (Zentella y Saldaña, 1996).

Los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, y los que tienen más importancia desde el punto de vista de la biología son los derivados del oxígeno y nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados del hidrógeno y el carbono, así como los formados por los metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

Para los RL derivados del oxígeno pueden mencionarse: Los singuletes delta y sigma del oxígeno (1O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas entidades son llamadas genéricamente *Especies derivadas de oxígeno* (Halliwell y Gutteridge, 1989).

ii) ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es un término colectivo que involucra no solo a los RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular de oxígeno, y que además son muy *reactivos*, como son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es un radical libre en sí, pero que está estrechamente relacionado con los RL debido a que es el principal precursor del radical hidroxilo, además del ácido hipocloroso (HClO), radicales alcoxilos ($RO\cdot$) o peroxilos ($RO_2\cdot$), entre otros que se muestran en la siguiente tabla (Gilbert, 1981).

| Radicales | No-Radicales |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Superóxido ($O_2^{\cdot -}$) | Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) |
| Hidroxilo ($\cdot OH$) | Ácido hipocloroso (HClO) |
| Peroxilo ($RO_2\cdot$) | Ozono (O_3) |
| Alcoxilo ($RO\cdot$) | Oxígeno singulete ($O^1 \Delta_g$) |
| Hidroperoxilo ($HO_2\cdot$) | Peroxinitrito (ONOO \cdot) |

(Gilbert, 1981).

iii) ESPECIES REACTIVAS DEL NITROGENO (RNS)

Otro grupo importante son las *especies reactivas de nitrógeno* (RNOS, por sus siglas en inglés), que aunque no todos sean RL, son especies involucradas con la formación de los RL, tales como el radical óxido nítrico (NO[•]), ión nitronio (NO₂⁺), bióxido de nitrógeno (NO₂), ión peroxinitrito (ONOO[•]), etc. (Pogrebnyaya y cols., 1975). De ellos, uno de los más destacados es el NO[•], que está involucrado en numerosos procesos biológicos, que entre otras funciones va desde el control de la presión sanguínea (factor de relajación de vasos y músculo liso) (Furchgott y Vanhoutte, 1989), hasta la neurotransmisión (el NO es un importante modulador neuronal) (Garthwaite y cols., 1988), siendo también un importante componente del sistema inmune en la vía fagocítica (Moncada y cols., 1991; Ignarro, 1990; Feldman y cols., 1993), y como recientemente se ha demostrado, es además un regulador de caspasas para la apoptosis (Peter y Young, 2002).

En la tabla periódica de los elementos, todos los metales de la primera fila (exceptuando al Zn) en el bloque *d* contienen electrones desapareados cuando se encuentran en alguna de sus valencias, de manera que pueden contribuir a la formación de RL biológicamente nocivos, siendo los metales más importantes el Mn, el Fe, el Co, el Ni y el Cu. Tales elementos además están presentes en todas las células de seres humanos. Con frecuencia se ubican en el centro activo de proteínas con o sin actividad enzimática (Zentella y Saldaña, 1996). Cuando, por alguna razón, aumenta la producción de ROS y RNS en el organismo, y la capacidad de las defensas antioxidantes endógenas resulta ser insuficiente, se establece la situación conocida como *Estrés oxidativo*, en la cual existe riesgo de daño celular severo y que puede conducir a la muerte celular. Cualquier situación patológica que altere la actividad redox, si incrementa el estrés oxidativo o modifica las defensas antioxidantes, puede conducir a un daño progresivo de la membrana celular y del tejido.

iiii) DAÑO OXIDATIVO

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, así como el producto de su dismutación, no son muy citotóxicos *per se*, su reactividad puede ser amplificada *in vitro* por interacciones con componentes específicos, así como con iones de metales de

transición, ciertas proteínas hemo y óxido nítrico. Los factores controladores de liberación endógena de radicales libres durante el daño al tejido incluyen:

- (i) Reclutamiento fagocítico y activación en los sitios de daño.
- (ii) Activación de enzimas productoras de superóxido.
- (iii) Interrupción del transporte mitocondrial de electrones; por ejemplo, durante la isquemia, permitiendo un escape de electrones durante la reperfusión de oxígeno.

Las especies reactivas son importantes para funciones biológicas:

Enzimas Radicales:

Ribonucleótido reductasa

Cobalamina (Vit. B12)

Especies reactivas de oxígeno:

$O_2^{\cdot -}$ como factor quimioestático

$\cdot OH$ como inhibidor de citocinas y factores quimioestáticos

H_2O_2 favoreciendo la adherencia a endotelio, estimulando la síntesis de quimocinas (MIP-1 α por macrófagos)

Especies reactivas de nitrógeno:

$ON\cdot$ down-regulation de moléculas de adhesión

(bajo ciertas condiciones), en parte por disminución de la activación de $NF\kappa-B$

Tanto ROS como RNS estimulan la producción de IL-8 por fibroblastos y células epiteliales

(Halliwell y Gutteridge, 2000)

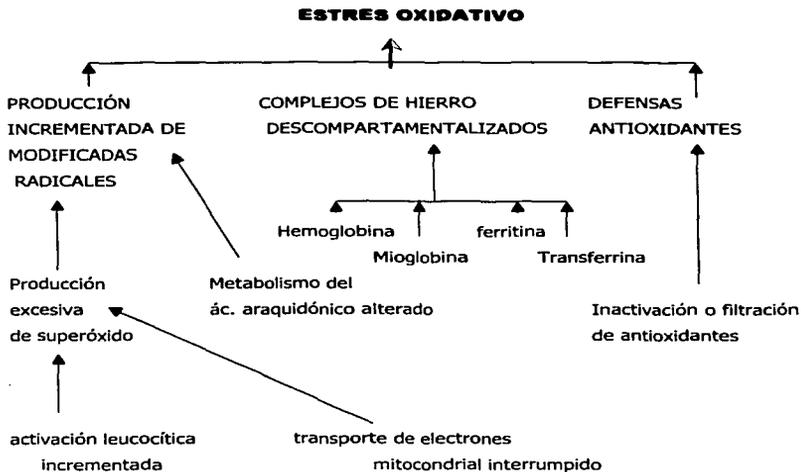
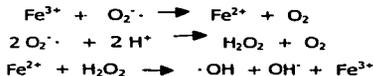


Fig. 2 Contribuciones de estados patológicos al estrés oxidativo

Los iones hierro o cobre catalizan la conversión del radical superóxido a especies tóxicas y altamente reactivas, a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Rice-Evans y Burdon, 1993):



La alta reactividad del radical hidroxilo causa que éste reaccione en un grado limitado de difusión, y propicia su reacción con las primeras moléculas con las cuales entra en contacto (dentro de 14Å después de 10⁻⁶ s). En consecuencia, la especie radical es

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

capaz de producir daño a ácidos grasos poliinsaturados de las cadenas de lípidos, a proteínas, a ácidos nucleicos y a carbohidratos (Rice-Evans y Burdon, 1993).

Todas las cadenas laterales de aminoácidos constituyentes de proteínas son susceptibles al ataque de radicales libres, pero algunas son más vulnerables que otras. Así, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres puede inducir cambios estructurales terciarios como consecuencia de modificaciones individuales a las cadenas laterales de aminoácidos. Así como la estructura secundaria es estabilizada por enlaces de hidrógeno entre grupos peptídicos, las interacciones de especies radicales con el esqueleto del polipéptido y la interferencia con grupos funcionales del péptido enlazados pueden causar modificaciones estructurales secundarias. Los desórdenes de la estructura secundaria pueden ocurrir también bajo ciertas condiciones de ataque de RL al átomo carbono- α del enlace peptídico (Rice-Evans y Burdon, 1993).

La generación de radicales en sitios inapropiados puede conducir a la destrucción de proteínas, ya que ellas también son blanco crítico para el ataque por RL, tanto intracelular como extracelularmente. Las proteínas pueden ser dañadas directamente, por interacciones específicas de RL con aminoácidos particularmente susceptibles, o pueden ser modificadas por los productos aldehídicos de la lipoperoxidación u oxidación de monosacáridos. Algunos constituyentes amino-acil cruciales para la función de proteínas, son particularmente vulnerables al daño por RL.

Las proteínas también son particularmente susceptibles al ataque de intermediarios de RL de lipoperoxidación, radicales alcoxil (LO^*) y peroxil (LOO^*). Estos pueden reaccionar con proteínas estrechamente asociadas con peroxidantes lipídicos. El daño a las proteínas de transporte de membrana afecta la homeostasis, conduciendo a una acumulación de calcio. Consecuentemente, el potencial de activación de fosfolipasas, proteasas, o de acumulación de calcio mitocondrial mediado por calcio puede llevar a la extensión del daño de la membrana, deterioro celular y ampliación de la lesión inicial.

Los derivados carbonilos, como los productos medulares de la lipoperoxidación, pueden interactuar con grupos amino en cadenas laterales de aminoácidos en proteínas (Fig. 3), alterando así su carga y su naturaleza (Rice-Evans y Burdon, 1993):

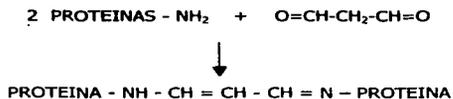


Fig.3 . Formación de bases de Schiff

iiii) PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales ferrilo de proteína hemo y radicales hidroxilo, pueden ser mediadores importantes de daño celular y extracelular por destrucción de membranas, lípidos, lipoproteínas o alteración de sistemas enzimáticos críticos, proteínas, canales iónicos, o en el compromiso de la función celular, el estado antioxidante, y la consecuente amplificación de la lesión inicial.

Cuando un RL reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros RL ya que induce una reacción en cadena que amplifica el fenómeno miles de veces. Tal es el caso de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en la que, aunque el RL inicial produce sólo efectos locales, el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa producen RL lipídicos que pueden tener efectos a distancia del sitio donde se formó el primer RL. Esto puede inducir cambios en las características de la permeabilidad de la membrana y en la capacidad de mantener los gradientes iónicos transmembranales, así como alterar la fluidez lipídica y modificar las interacciones lípido-proteína, ocasionando finalmente un daño en la función celular.

El radical libre iniciador, que puede ser el radical hidroxilo, remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos poliinsaturados. Esto conduce a que un electrón quede desapareado en el carbono de donde salió el hidrógeno, creando con ello un radical de ácido graso. Este último realiza un rearrreglo molecular interno y forma un dieno conjugado, que a su vez reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical lipoperóxido capaz de sustraer un hidrógeno del ácido graso vecino para formar el hidroperóxido y continuar la reacción en cadena hasta

que eventualmente reaccionen dos radicales libres y con ello se llegue a la terminación del proceso.

La peroxidación lipídica puede ser iniciada por un radical libre primario, el cual es suficientemente reactivo para extraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno reactivo de un ácido graso insaturado. La formación de las especies iniciadoras se acompaña de un reacomodo del enlace que resulta en la estabilización para la formación del dieno conjugado. El radical lipídico toma oxígeno para formar el radical peroxilo. Los radicales peroxilo pueden, a su vez, combinarse con otros, o pueden atacar proteínas de membrana; los radicales peroxilo también son capaces de abstraer hidrógeno de las cadenas de ácidos grasos adyacentes en una membrana y así propagar la reacción en cadena de lipoperoxidación. Por consiguiente, la sola iniciación del evento puede resultar en la conversión de un vasto número de cadenas de ácidos grasos en monohidroperóxidos de lípidos (fig. 4).

Un paso alterno en el proceso de la lipoperoxidación es a partir del lipoperoxilo, cuando se forman los peróxidos cíclicos, los que pueden, por un lado, conducir a la formación de endoperóxidos cíclicos por la acción de la prostaglandina endoperóxido sintetasa (ciclooxigenasa), y con ésto se abre la posibilidad ya sea de dar lugar a prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, o bien de continuar hacia la vía de la degradación para dar lugar a la formación del malondialdehído (MDA) y otros productos terminales como son varios aldehídos, algunos hidrocarburos como el etano y el pentano, y otros residuos orgánicos. Estas sustancias pueden difundirse a cierta distancia del sitio de producción y originar edema celular y cambiar la permeabilidad vascular, producir inflamación y quimiotaxis. Además algunos pueden cambiar la actividad de la fosfolipasa e inducir la salida del ácido araquidónico, y con ello conducir a la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, algunos de los cuales actúan como mediadores de la inflamación. De esta manera, la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana, al ser responsable de la pérdida de la fluidez, altera las funciones secretoras y los gradientes transmembranales de la membrana plasmática y las de los orgánulos celulares (Zentella y cols., 1994).

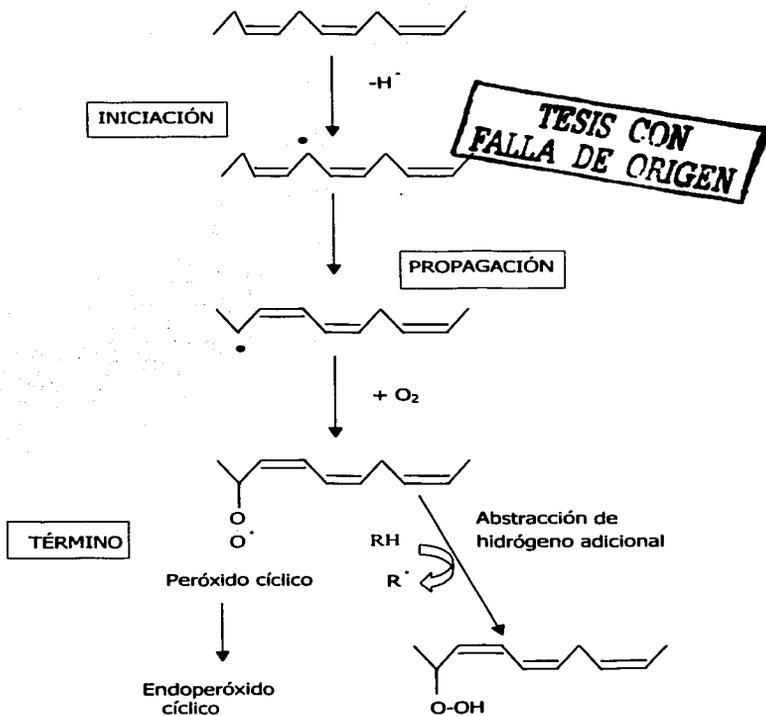


Fig. 4. Iniciación y propagación de la peroxidación lipídica por radicales libres

Los hidropéroxidos de lípidos son moléculas muy estables bajo condiciones fisiológicas, pero su descomposición es catalizada por metales de transición o complejos hemo-proteína, formando radicales alcoxil y peroxil, los cuales pueden re-iniciar el proceso y amplificar los eventos iniciales. Tanto el Fe(II) como el Fe(III) son catalizadores efectivos para la degradación de hidropéroxido.

Los complejos de hierro reducido reaccionan con hidropéroxidos lipídicos (LOOH) para dar radicales alcoxil (LO[·]):



Un punto esencial de la lipoperoxidación es que los ácidos grasos no saturados, al ser degradados por este mecanismo, conducen, ya sea de una manera directa o indirecta, a la obtención de MDA como producto final, el cual es extremadamente reactivo con grupos amino provenientes de proteínas, y generar así bases de Schiff que se pueden identificar por sus características de exhibir fluorescencia. La lipoperoxidación aumenta la rigidez de la membrana y ésta puede disminuir la presencia de enzimas unidas a membrana y de receptores hormonales, por lo que este fenómeno se ha identificado como el de mayor importancia en el daño membranar pues altera las propiedades fisiológicas, ya sea de fluidez, permeabilidad y transporte de la misma.

b) ↻ MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ↻

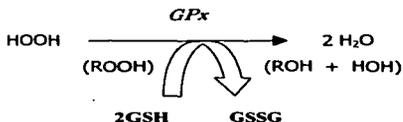
Dentro de las células existen sistemas protectores que evitan el incremento excesivo de especies oxidantes indeseables. Dentro de estos sistemas hay tres enzimas que son la piedra angular de esta protección: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

La SOD en la mitocondria convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno; esta enzima es dependiente de manganeso y cuando se encuentra en el citosol, tiene como cofactores al cobre y al zinc. La GPx y la glutatión reductasa constituyen el segundo gran sistema antioxidante celular; la GPx, enzima citosólica cuyo cofactor es el selenio, transforma al peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y participan en la reacción

dos moléculas de glutatión reducido (GSH) que ceden dos hidrógenos, formando entre ellas un enlace disulfuro (GSSH). El glutatión se regenera mediante la glutatión reductasa en presencia de NADPH. Finalmente, la catalasa, enzima confinada a los peroxisomas, destruye al peróxido de hidrógeno por dismutación.

Otro tipo de protección la brindan las moléculas capaces de atrapar y eliminar a los radicales libres; entre ellas están el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina; sin embargo, la acción de éstas moléculas es inespecífica y su eficacia a las concentraciones normales a las que se encuentran no es muy alta. También las vitaminas E y C ejercen una protección complementaria: la vitamina E reacciona con los RL formando un radical tocoferilo que, por ser estable, suspende la cadena de reacciones. La vitamina C reacciona con el radical tocoferilo, regenerando la vitamina E y quedando como radical ascorbilo, también muy estable. Los flavonoides, familia de polifenoles de origen vegetal, son también moléculas antioxidantes. En cuanto al β -caroteno, éste puede inactivar cientos de moléculas de oxígeno singulete mediante un mecanismo en el cual la energía del oxígeno singulete se utiliza en la conversión de la formación del β -caroteno al isómero *trans* y viceversa.

Las peroxidases que contienen selenio comprenden una familia de enzimas, en la cual existen cuatro tipos: la clásica, la plasmática, la fosfolípido hidroperóxido específica y la gastrointestinal. La glutatión peroxidasa clásica (cGpx ó GPx-1) reduce peróxido de hidrógeno por el tripéptido GSH, catalizando la siguiente reacción:



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La enzima es usada para la reducción de peróxidos orgánicos, incluyendo los peróxidos de ácidos grasos libres y otros lípidos. Aparentemente, los peróxidos de ácidos grasos esterificados no son reconocidos por la enzima. La actividad de GPx resulta en la conversión de dos moléculas de glutatión (GSH) al dímero glutatión (GSSG) (Brody, 1994). La cGPx, de forma similar a las otras glutatión peroxidases, contiene una triada catalítica que consiste en selenocisteína, glutamina y triptófano. La GPx consiste de cuatro

subunidades protéicas, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio en su sitio activo, formando selenocisteína. El grupo selenol de la selenocisteína es activado por un enlace de un hidrógeno para reaccionar con peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos solubles. La GPx tiene la peculiaridad de no generar radicales libres al reducir hidroperóxidos. Existe evidencia de que ninguna otra selenoproteína puede proteger a ratones contra el estrés oxidativo tan eficientemente como la cGPx (Haan y cols., 1988; Cheg y cols., 1988). La remoción de peróxido de hidrógeno por cGPx en leucocitos está acoplada al metabolismo de la glucosa por el paso de la pentosa fosfato por la glutatión reductasa dependiente de NADPH.

La glutatión peroxidasa plasmática (pGPx) es expresada como una preproteína equipada con una secuencia líder típica, dirigiendo la enzima al espacio extracelular. La especificidad de pGPx por hidroperóxidos parece ser similar a la especificidad que expresa cGPx, pero se ha reportado que también reduce grupos hidroperóxido de lípidos complejos (Yamamoto y Takahashi, 1993). En 1994, Björnstedt y colaboradores identificaron a la tioredoxina y la glutaredoxina como sustratos alternativos, ya que una comparación estructural sugiere que enlaza menos firmemente al glutatión. Extracelularmente, el GSH se encuentra presente por debajo del rango micromolar. Por la escasez de sustratos extracelulares para pGPx, ésta no puede ser considerada como un antioxidante eficiente, pero puede representar un sensor redox extracelular relevante para la regulación de las respuestas inflamatorias. Se ha implicado a la cantidad de peróxido extracelular en la regulación de la biosíntesis de prostaglandinas. La 5-lipooxigenasa, enzima clave para la biosíntesis de leucotrienos, necesita cierto tono de peróxido para estar activa. La formación de lípidos proinflamatorios mediadores puede depender del peróxido previamente liberado por fagocitos activados. Así, esta peroxidasa de amplio espectro puede prevenir la amplificación de señales de estímulos inflamatorios irrelevantes (Brigelius-Flohe y cols., 2000).

Otro miembro de la familia es la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa (PHGPx); ésta reduce grupos hidroperóxido de lípidos complejos integrados en las membranas celulares, así que es la defensa primaria contra el daño oxidativo de membrana. Reduce toda clase de hidroperóxidos desde H_2O_2 a hidroperóxidos de fosfatidilcolina e hidroperóxidos de ésteres de colesterol en lipoproteínas (Ursini y cols., 1982; Ursini y cols., 1985; Ursini y cols., 1987).

Los radicales peroxilo, generados por adición de oxígeno molecular a radicales alquilo, reaccionan rápidamente con tocoferoles para generar alquíl-hidroperóxidos, los cuales son sustratos de PHGPx (Hoekstra, 1975; Diplock, 1978).

Otra especialista de la familia Gpx es la gatrointestinal (GI-GPx), la cual se encuentra en endotelio epitelial del tracto intestinal, desde esófago hasta colon distal de la rata; en humanos también se encuentra en hígado. Se ha propuesto que la GI-GPx protege contra los hidroperóxidos contenidos en los alimentos o los formados por las células intestinales, o bien los formados en hígado luego de la absorción de xenobióticos (Brigelius-Flohe y cols., 2000).

ANEXO C

∞ BIOSÍNTESIS DEL QUIN POR LA VÍA DE LA KINURENINA ∞

I. QUIN EN LA VÍA DE LA KINURENINA

El QUIN es un metabolito del L-triptofano que se forma en la vía metabólica de la L-kinurenina (Vender, 1975), que es la mayor vía oxidativa del catabolismo del triptofano. La vía de la kinurenina ha sido identificada en cerebro, hígado, y esporádicamente en intestino humano, así como en cerebro e hígado de rata y otros mamíferos pequeños (Wolfensberger y cols., 1984; Moroni y cols., 1984; Vender, 1975), pero se cree que su presencia en intestino humano está más relacionada a la actividad de microorganismos (bacterias) que catabolizan al triptofano humano como vía alternativa (Vender, 1975).

II. METABOLISMOS DEL L-TRIPTOFANO

El ser humano sintetiza sólo 9 de los 20 aminoácidos naturales. Por ello, los demás aminoácidos se deben ingerir en la dieta. Por ésto son denominados *aminoácidos esenciales*. El triptofano es un aminoácido esencial, altamente hidrofóbico. Los aminoácidos son fundamentales para la formación de proteínas y otras biomoléculas; sin embargo, cuando sobrepasan las necesidades metabólicas y no pueden almacenarse, son degradadas principalmente en el hígado (Stryer y cols., 1995).

La utilización del L-triptofano es variada en mamíferos: puede ser empleado para la formación de nucleótidos (para la formación de DNA), proteínas, o degradarse y formar alanina, o hasta piruvato y servir otra vez para sintetizarse él mismo ó quizá otros aminoácidos (Stryer y cols., 1995).

En el cerebro y en el hígado, el L-triptofano es utilizado para la síntesis de melatonina (o como producto intermediario también), ácido kinurénico, glutaril Co-A, ácido picolínico, QUIN ó para la formación de nicotinamida y nicotinamida dinucleótido (NAD), principalmente mediante la vía de la kinurenina (Beadle y cols., 1997; Bender, 1989; Lombardi y cols., 1983; Wolfensberger y cols., 1984; Stone, 1993).

III. VÍA DE LA KINURENINA

El ácido kinurénico fue reconocido después de un largo tiempo como un metabolito del triptofano en la orina canina (Ellinger, 1904) y no fue sino hasta 1947 que la vía de la kinurenina fue reconocida como la mayor ruta para la conversión del L-triptofano a nicotinamida y sus conjugados nucleótidos (Beadle y cols., 1947). La vía de la kinurenina es un importante factor para monitorear la deficiencia de la piridoxina, ya que esta vitamina es un importante cofactor de algunas de las enzimas de la kinurenina (Stone 1993). Algunos años después, el QUIN fue aceptado como un metabolito intermediario del L-triptofano (Gholson y cols., 1964).

Con el descubrimiento de las neuronas relacionadas con la 5-HT (5-*Hidroxitriptamina* o serotonina, un neurotransmisor local), el interés de los aspectos farmacológicos y neurocientíficos del triptofano se enfocó hacia su papel como precursor de 5-HT. Sin embargo, y debido a que sólo el 1 % del triptofano de la dieta llega a ser convertido en 5-hidroxitriptofano (Peters, 1991), y siendo que las alteraciones en triptofano, triptofano hidroxilasa y niveles de 5-hidroxitriptofano fueron interpretados en términos de sus efectos sobre la 5-TH, surgió entonces la interrogante de qué era lo que ocurría en el metabolismo del L-triptofano (Price y cols., 1990), en donde, en mayor o menor grado, la vía de la kinurenina se ve afectada. Esta situación persistió hasta el descubrimiento del QUIN y el ácido kinurénico, dos metabolitos del triptofano encontrados en altas concentraciones en el hígado, así como en los efectos pronunciados en la función neuronal; mostrándose una actividad elevada en los receptores para aminoácidos excitadores (AAE's) de las neuronas centrales (Stone y Perkins, 1981; Stone y Perkins, 1982; Stone y Perkins, 1983). Estos mismos compuestos también han sido demostrados como marcadores de actividad convulsionante cuando son inyectados directamente en el cerebro de roedores (Lapin, 1978a; Lapin, 1978b; Lapin, 1981a; Lapin, 1981b), pero el significado de estas observaciones no fue develado sino hasta principios de los 80's. Desde 1980, y en paralelo con el incremento de las sustancias de interés en el papel de los receptores para aminoácidos excitadores, estos agentes fueron asociados con la neurotransmisión, aprendizaje, memoria y enfermedades neurodegenerativas (Choi, 1988; Stone y Burton, 1988; Collingridge y Lester, 1989), y desde entonces y hasta la fecha, el interés por el análisis y entendimiento de la función de las vías del triptofano en el sistema nervioso central ha ido en aumento.

La vía de la kinurenina se lleva a cabo más notablemente en el hígado, pero también en cerebro: partiendo del triptofano (un indol) como sustrato, el anillo pirrol del triptofano es oxidado por la enzima *Triptofano-2,3-Dioxigenasa* (TDO) ó *Indolamina-2,3-dioxigenasa* (IDO). En el mismo paso también puede involucrarse una triptofano hidroxilasa que lo hidroxila en la posición 5 para formar el 5-hidroxitriptofano. La enzima es dependiente del grupo hemo, con vida media próxima a las dos horas en mamíferos. Ésta actividad llega a su fin al ser rápidamente modificada por un sustrato afín (Bender, 1989b).

Una vez que la TDO ataca al L-triptofano, se rompe el anillo pirrólico (por oxidación) exactamente en la posición 3, y se forman compuestos carbonílicos en la posición 1 y 2 del anillo bencénico (a un ácido carboxílico en el 1 y a un N-carboxialdehído en el 2), a lo que se le denomina como formilkinurenina; ésta molécula a su vez es atacada por otra enzima, la formilasa kinurenina, que como su nombre lo indica, descarboxila el extremo N-aldehído y se pierde el aldehído y la parte carbocíclica del indol, quedándose sólo con la amina en esa posición, y formando al ácido o-amino-2-aza,4-oxo-butilbenzoico, mejor conocido como kinurenina que se activa sólo en el metabolismo del L-triptofano. La administración del L-triptofano fue necesaria para descifrar la vía de la kinurenina hasta la formilkinurenina como primera etapa (Higuchi y Hayaishi, 1967).

A su vez, la kinurenina puede seguir cuatro posibles rutas:

1) En presencia de la enzima *kinurenasa*, nuevamente es descarboxilada, pero ahora sobre la cadena butílica (que está más expuesta al ataque, ya que el anillo bencílico, gracias a su resonancia interna, permanece más estable) y forma al ácido o-aminobenzóico ó *Ácido antranílico*, que eventualmente, y dependiendo de las condiciones, formará el ácido 5-hidroxi-antranílico o al ácido 3-hidroxi-antranílico.

2) La segunda ruta puede suceder mediante otras descarboxilasas, cuando eliminan el extremo más reactivo de la molécula (el extremo carboxílico de la cadena) y forman al 1-bencen(3)-diamilpropanona o *kinuramina* (misma que también se puede formar por la *formiltriptamina* con triptamina como sustrato, que a su vez es otro producto intermediario de un paso previo, *una descarboxilación primaria del L-triptofano*).

3) La tercera posibilidad ocurrirá cuando la *kinurenina* enfrente una reacción de transaminación por parte de la *kinurenina aminotransferasa* (L-KAT) (Kido, 1984); esta transaminación se traduce a una reacción de condensación por parte de la *kinurenina*

aminotransferasa (KAT), que como su nombre lo indica, el grupo amino (que tiene que estar como imino) inicia el ataque sobre el carbono del ácido carboxílico, donde por cierto, se encuentra enlazado el otro grupo amino, mismo que tendrá que romperse ya que la gran polaridad que tiene el carbono del ácido carboxílico atrae los electrones de ese carbono, haciendo que este carbono quede por momentos deficiente de electrones, mismos que acepta del grupo amino, sólo que al formar el anillo, el nitrógeno enlazante se queda con cuatro enlaces y el carbono con cinco, por lo que el carbono suelta un grupo amino (el amino libre), y por obvias razones se queda con el otro N del grupo enlazante. En esos momentos, el grupo enlazante está rico en electrones (de ahí su nombre); sin embargo, sigue estableciendo cuatro enlaces, por lo que tiene que soltar un hidrógeno, y el átomo de N queda con un par de electrones cargados, mismos que mete al anillo e inicia la resonancia, hasta que finalmente se equilibra formando una doble ligadura hacia el grupo carboxílico por mayor atracción. Así se forma una quinolina, en la que como ya se observó, quedó sustituido en la posición 2 por un ácido carboxílico y en el medio celular al que se encuentra, se protona el oxígeno de la cetona que se encuentra en la posición 4, dejando en esa posición un alcohol (en lugar de la cetona), formando finalmente al ácido 2-carboxi,4-ol quinolina o *ácido kinurenico*.

La L-KAT fue localizada primero en fracciones mitocondriales de homogenados de cerebro y fracciones solubles en menor cantidad, y por gradiente se encontró en fracciones en SNC, con gran actividad en el bulbo olfatorio en cantidades 10 veces más que en el cerebelo – con piruvato como amino aceptor -, y actividad en neocorteza frontal, hipotálamo y neoestriado en un valor de la mitad del bulbo olfatorio (Okuno y cols., 1991).

Por otra parte, se observó un incremento en la actividad de esta enzima de 180 % respecto al control, acompañado esto de una profunda pérdida neuronal en cuerpo estriado y gliosis días después de que se inyectó ácido quinolínico intraestritalmente a ratas, demostrando con ello la importancia de la L-KAT aminotransferasa de encontrarse en distintas regiones cerebrales y la habilidad de esas regiones de convertir L-kinurenina a ácido quinolínico, además de confirmar que el ácido quinolínico es una potente neurotoxina (Tutski y cols., 1989). Se demostró con técnicas inmunoenzimáticas que la localización visual de la L-KAT se encuentra en astrocitos de estriado y neuronas de tamaño medio también en el estriado (Schwarcz & Du, 1991; Roberts y cols., 1992).

4) En el cuarto camino de la ruta metabólica del L-triptofano, la kinurenina puede sufrir una hidroxilación enzimática por parte de la *kinurenina 3-hidroxilasa*, sobre la posición 3, y formar a la 3-hidroxicinurenina, que ya sea que se vuelva a condensar (de una manera semejante a la formación del *ácido kinurénico*), pero esta vez formando *ácido xanturénico*, o bien mediante el ataque de la *kinurenasa*, cortará el residuo más expuesto, que en este caso es el residuo aminoacil, y formará el *ácido 3-hidroxiantranílico*. Este mismo sufre una oxidación por parte de la *ácido-3-hidroxiantranílicooxigenasa* (3HAO), rompiendo nuevamente el anillo bencénico y atacando al carbono de la posición 3 del anillo en donde se encuentra la base más fuerte, involucrando en este paso la producción inicial de un semialdehído aminocarboximucónico y experimentando una ciclización no-enzimática (Long y col., 1954), o bien mediante la *picolin-carboxilasa*, formará el ácido picolínico.

La actividad del 3-HAO *in vitro* ha sido estudiada por la administración de ácido 3-hidroxiantranílico en rebanadas de cuerpo estriado, la cual produjo la formación del *ácido quinolínico* (Speciale y Schwarcz, 1991); una vez que el estriado fue lesionado con *ácido iboténico*, en las rebanadas se encontró un contenido 6 veces mayor de QUIN intracelular, lo que aunado a otros indicios, demuestra una participación de células gliales en la producción de 3-HAO (Vezzani y col., 1991), llevando a proponer que la 3-HAO no es una enzima limitante en la producción del QUIN por la vía de la kinurenina.

Finalmente, el ácido *2-amino-1,3-dicarboxilhexanol* (2ADH) puede ser condensado y formar el ácido aminomucónico, que pasa a ácido queto-ádicico para formar a la *Glutaril-Coenzima A*, o por otra parte, experimentar el ataque de la *quinolinato fosforibosil-transferasa* y condensarse para formar una piridina, conocida como ácido-2,3-piridil-dicarboxílico, o *QUIN*.

Se ha demostrado que la kinurenasa se encuentra en muchos otros tejidos incluyendo cerebro. En ratas, menos del 0.2 % de actividad se encuentra en el hígado, y en humanos la enzima cerebral se encuentra presente en relativamente altas cantidades (1% más que en el hígado) (Kawai y col., 1988; Okuno y Kido, 1991). La kinurenina hidroxilasa aparentemente está también en baja actividad (Battle y Verity, 1981; Gal y Sherman, 1978; Uemura y Hirai, 1991), lo que conduce a plantearse si la habilidad del cerebro de metabolizarla es propia de las kinureninas a lo largo de la vía descrita de la L-kinurenina a *3-hidroxicinurenina* y a *ácido 3-hidroxiantranílico*; sin embargo, aunque muestra gran

afinidad por la 3-hidroxi-kinurenina como sustrato, la kinurenasa es también afín a hidrolizar a la L-kinurenina en *ácido antranílico* (McDermot, 1973; Bender-McCreanor, 1982), y poder así subsecuentemente sufrir hidroxilación a *ácido 5-ó 3-hidroxi-antranílico* por una vía no específica microsomal de enzimas hidrolíticas (Bender, 1989b). Esto puede explicarse por la capacidad del cerebro de formar *3-hidroxi-antranilato* directamente de ácido antranílico (Barant y Schwartz, 1990), así como de fuentes misceláneas que también accesan al cerebro, proporcionando alguna entrada externa a la vía de la kinurenina independientemente del triptofano cerebral.

La nicotilalanina, un análogo de la L-kinurenina, originalmente reportado como un potencial inhibidor de la kinureninasa y kinurenina hidroxilasa (Decker y col., 1963), ha sido encontrada en niveles elevados con el contenido de ácido kinurénico cerebral a expensas de la disminución del QUIN (Moroni y col., 1991a; Connick y col., 1992). El efecto se ha observado especialmente cuando la administración de la nicotilalanina va acompañada por carga de triptofano, y cuando los niveles cerebrales de kinurenato pueden incrementarse 20 veces su valor basal (Connick y col., 1992). En ratones con niveles elevados de kinurenato cerebral, la nicotilalanina suprimió su captura (Connick y col., 1992). Aunque las dosis requeridas fueron relativamente altas, pueden ser de valor terapéutico en el desarrollo de otros análogos de kinureninas o nicotilalaninas con el incremento cerebral de kinurenato a rangos de quinolinato. Esto puede ser de valor especial, por ejemplo, en aquellos casos con altas concentraciones de QUIN, tales como las infecciones virales.

La conversión de L-kinurenina a kinurenato es llevada a cabo por una reacción de transaminación que puede ser a través de algunas enzimas transaminasas que se han encontrado en estructuras viscerales (Kido, 1984). Una de esas enzimas es idéntica bioquímica, fisiológica e inmunológicamente a una enzima presente en el cerebro de rata (Minatogawa y cols., 1974). Esto ha postulado que su papel central sea la síntesis cerebral de kinurenato (Okuno, 1990). Fue confirmado después que en el cerebro de la rata su actividad residía en una sola proteína que haría la función equivalente, ya sea usando su piruvato, o el 2-oxoglutarato como grupo aceptor amino. La enzima fue localizada al principio en la fracción mitocondrial en homogenados de cerebro, detectada en cantidades significantes en la fracción soluble. También hay evidencia de encontrarla en canales de

neuronas del SNC con gran actividad, y en el bulbo olfatorio en aproximadamente 10 veces más la cantidad que en cerebelo (usando piruvato como aceptor amino).

La actividad del kinurenato en neocorteza frontal, hipotálamo y estriado fue aproximadamente uno y medio veces más activa que en el sistema olfatorio (Okuno y col., 1991a). En adición, una elevación de la actividad enzimática de alrededor de 180 % vs control fue notada en el estriado de animales que exhibían profunda pérdida neuronal e infiltración de gliosis, algunos días después de la inyección QUIN (Okuno y col., 1991a). Esto llevó a indicar la localización preferencial de la enzima en el compartimiento glial, una sugerencia que ha recibido apoyo directo por la demostración de que cultivos de astrocitos o tejido de glioma humano podrían sintetizar kinurenato y quinolinato a partir de L-kinurenina (Vezzani y col., 1990; 1991).

Aunque haya una mínima cantidad de esta enzima en el SNC, la aspartato aminotransferasa es también capaz de formar kinurenato de L-kinurenina, con una extensión neuronal predominante (Okuno y col., 1991a). Existe también una buena correlación entre la actividad de la aminotransferasa y la liberación del kinurenato por parte de neuronas y preparaciones ricas en células gliales, adicionándoles excitotoxinas (Turski y col., 1989; Okuno y col., 1991a). El uso de métodos inmunohistoquímicos ha seguido una localización visual directa del crecimiento de astrocitos con kinurenina aminotransferasa (Schwarcz y Du, 1991). En otros reportes (Du y col., 1991; Fusal, 1992) se detalla la distribución de la kinurenina aminotransferasa en diferentes regiones del hipocampo de rata, la gran densidad de células con ese contenido en el estriado y la baja densidad molecular en células granulosas, todas de apariencia no piramidal. Roberts y colaboradores (1992), mediante microscopía electrónica, encontraron niveles de kinurenina aminotransferasa en estriado de rata, aunque presente predominantemente en células gliales, distribuida a través del núcleo y el citoplasma; la enzima también fue encontrada en neuronas largas y de tamaño medio, y aquí se ubicaron en los organelos citoplásmicos asociados a membranas.

Aunque las investigaciones sobre la vía de la kinurenina y los efectos de sus metabolitos en el SNC se han hecho exitosamente a nivel experimental, por su relevancia potencial para el entendimiento de la regulación de los receptores para aminoácidos excitadores en humanos, la actividad de la kinurenina aminotransferasa de cerebro humano es fundamental.