



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COBRE EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD
DE HUNTINGTON EN RATAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN CARLOS MARTÍNEZ LAZCANO

MÉXICO, D.F.

2004



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juan Carlos.

Martínez Lazcano

FECHA: 27 - Mayo - 2004

FIRMA: 

Jurado asignado

Presidente
Vocal
Secretario
1er. Suplente
2o. Suplente

PROF: RUTH ELIZABETH ROMAN PALACIOS
PROF: ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ
PROF: ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL
PROF: JAVIER ALFREDO CARBALLO PEREA
PROF: MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO


Sitio donde se desarrolló el tema

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

Asesor:
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL

Supervisor técnico
DR. CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

Sustentante
JUAN CARLOS MARTÍNEZ LAZCANO







DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi padre el Sr. Juan Martínez Flores por su consejo siempre oportuno, apoyo, paciencia y valioso ejemplo de rectitud y perseverancia.

A mi madre la Sra. Concepción Lázcano López por la fuerza con la que me educo, su valor ante la vida, serenidad, madurez, alegría y sobre todo por ser un claro ejemplo de que la vida Dios nos la dio para buscar siempre la felicidad a cualquier precio

A Elsa Aldana Acevedo por que jamás me cansare de darle gracias a Dios por hacer que nuestros caminos coincidieran durante tanto tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por hacerme parte de su maravillosa obra

A mis Hermanos:

Francisco Javier Martínez Lazcano, Miriam Margarita Martínez Lazcano; por haber compartido sueños, alegrías, tristezas y temores.

Selene Suárez Pérez, Zayra Martínez Pérez e Iván Martínez Pérez; por que me consideran parte importante de su familia.

A mis tios, en especial a:

La Sra. Luisa Lazcano López por que con su apoyo indirecto me ayudo a hacer posible mi sueño.

La Sra. Mercedes Martínez Flores por que su frase "Las cosas son de quien las usa" en mi vida tiene mas valor del que ella misma piensa.

A mis amigos:

Sergio Dario, Sergio, Ventura, Rosa, Concepción, Karla, Patricia Díaz, Karina, German, Liliana, Jorge Bretón, Roberto, Juanita, Gabriela Medina Mateos y Mario a quien nunca olvidaremos.

A mis maestros:

Aquellos de la educación primaria, ya que sin su esfuerzo ninguna persona incluyéndome a mi podríamos leer y entender estas palabras.

A todos mis maestros de los que tengo que confesar he tomado parte de su gran conocimiento.

A mis maestros del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía:

Francisca Pérez Severiano por ser en el presente mi mejor ejemplo a seguir en lo profesional

Laura Osorio Rico por enseñarme que todo problema se resuelve más fácil con una gran sonrisa

Abel Santamaría del Ángel por ser mi asesor además de dedicar su tiempo y paciencia en la a veces interminable corrección de este trabajo experimental y escrito GRACIAS.

En toda investigación como en la vida no hay valor mas grande que contar con un amigo que esta siempre dispuesto a ayudarnos a resolver cualquier problema en la parte experimental, en la parte teórica, con una palmada de apoyo, una palabra de confianza, o un consejo personal, porque hasta ahí esta dispuesto a ayudarte, por lo tanto un solo gracias no bastaría para recompensar a esa persona, sin embargo quiero externalar mi agradecimiento *a mi maestra Sonia Galvan Arzate.*

A la Dra. Beatriz Medina por haberme transmitido uno de los grandes amores y pasiones de su vida el amor a la Bioquímica.

Al Dr. Camilo Ríos Castañeda por haberme aceptado en su selecto grupo de investigadores

Al Dr. Alejandro Baeza por ser el primer investigador que me acepto como su alumno y al cual no pude demostrar que puedo hacer las cosas seriamente, y por su gran filosofía de la vida.

A la Q.F.B. Abigail Flores Escartin por ayudarme en la parte experimental, además de brindarme su amistad.

A todas las personas que por un momento de deliriums-brutus no alcanzo a recordar y han contribuido a este trabajo gracias

*No cabe duda que
en el Amor como en la vida
los frutos vienen después
de un gran dolor ...*

*...Nuestras horas son minutos
cuando esperamos saber,
y siglos cuando sabemos
lo que podemos aprender...*

Antonio Machado

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
TABLA DE ABREVIATURAS	5
CAPITULO I INTRODUCCIÓN	7
LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	7
Características generales de la enfermedad	7
Características histopatológicas	10
Etiología de la EH	10
Receptores glutamatérgicos	11
Estrés oxidativo y efectos bioquímicos	13
Modelos experimentales de la EH	14
Tratamientos en la enfermedad de EH	17
GANGLIOS BASALES (NÚCLEOS CEREBRALES)	19
Consideraciones Anatómicas y Fisiológicas	19
Consideraciones Farmacológicas	21
Consideraciones Patológicas	22
LA VÍA DE LA KINURENINA	24
Kinureninas en el cerebro	29
Farmacología de las kinureninas	30
Neurotoxicidad de las kinureninas	32
El QUIN como una herramienta experimental	33
RADICALES LIBRES Y SU IMPLICACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	36
Radicales Libres	37
Reacción de Fenton	37
Peroxidación por radicales libres	38
Fuentes de aldehídos reactivos	40
Receptores NMDA y Radicales Libres	41
Metales de transición en eventos oxidativos	42
EL COBRE	43
Absorción	43
Transporte y distribución	43
Función Bioquímica del cobre	44
El cobre y los Receptores NMDA	48
CAPITULO II PROCESO METODOLÓGICO	49
2.1 Justificación y planteamiento del problema	49
2.2. Objetivo general	50
2.3. Objetivos particulares	50
2.4. Hipótesis	51
2.5. Variables	52
2.6. Reactivos y material	53
2.6.1 Reactivos	53
2.6.2. Soluciones	54
2.6.3. Animales	55
2.7. Diseño de investigación	56
2.7.1. Evaluación de la peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado	56

2.7.2. Cobre y niveles de GABA en el cuerpo estriado	57
2.7.3. Cobre y actividad de la ceruloplasmina después de la administración del QUIN	57
2.8. Métodos	
2.8.1. Administración estereotóxica del QUIN	58
2.8.2. Determinación de la peroxidación de lípidos	58
2.8.3. Determinación de proteínas por el método de Lowry	59
2.8.4. Disección del cuerpo estriado	59
2.8.5. Extracción del líquido cefalo raquídeo	59
2.8.6. Determinación de la actividad de ceruloplasmina	60
2.8.7. Medición de GABA por cromatografía líquida de alta resolución	60
2.9. Análisis estadístico	61
CAPITULO 3 RESULTADOS	
3.1. Efecto del cobre i.p. sobre la peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado	63
3.2. Efecto del cobre sobre la peroxidación inducida por el QUIN	65
3.3. Efecto del cobre y del ácido ascórbico i.p. en la peroxidación de lípidos después de la administración de QUIN	67
3.4. Efecto del cobre sobre los niveles de GABA en el cuerpo estriado después de la administración del QUIN.	69
3.5. Efecto del cobre sobre la actividad de la ceruloplasmina después de la administración del QUIN.	71
CAPITULO 4 DISCUSIÓN	73
CAPITULO 5 CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	79

RESUMEN

El ácido quinolínico (QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptofano que se forma en la vía de la kinurenina en el SNC y favorece la generación de eventos tóxicos en el SNC, tales como la generación de radicales libres (RL), la peroxidación de lípidos (PL) y el estrés oxidativo. El QUIN presenta actividad excitotóxica cuando actúa como agonista en receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos receptores son canales permeables a cationes y su activación prolongada, junto con la entrada masiva de calcio (Ca^{2+}), conduce a eventos tóxicos tales como alteraciones en el metabolismo energético, daño oxidativo y muerte celular por apoptosis. Además, es utilizado para producir un modelo experimental de la Enfermedad de Huntington en ratas. Uno de los factores comúnmente asociados a la producción de RL en neuropatías humanas es el depósito de hierro en el cerebro. Por su parte, el cobre (Cu^{2+}), un metal abundante en SNC, está presente en múltiples complejos enzimáticos; p.ej., ceruloplasmina, que es el principal transportador de Cu al cerebro e interviene en la oxidación de Fe (II) a Fe (III), un paso necesario en la movilización y detoxificación del Fe, regulando así la actividad redox. Recientemente se ha propuesto que el Cu^{2+} ejerce un papel modulador sobre la actividad de receptores NMDA, lo que sugiere que bien podría tener un efecto protector sobre la neurotoxicidad inducida por el QUIN. En este trabajo evaluamos el papel de una administración sistémica aguda de Cu sobre marcadores de neurotoxicidad inducida por el QUIN *in vivo*. Para ello se emplearon ratas Wistar machos (200-250 g, n=6-8). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- a) Un primer grupo de animales recibió dosis de 2.5, 5.0 y 7.5 mg / kg de CuSO_4 i.p. 30 minutos antes de la lesión intraestriatal con QUIN. En éstos se evaluó la PL basal y la producida por el QUIN.
- b) Después de demostrado el efecto protector del CuSO_4 , éste se probó contra el ascorbato, el cual ha sido demostrado que puede disminuir los niveles de cobre en ciertas regiones cerebrales.

c) Otro grupo de animales fue tratado con la dosis única de 5.0 mg/kg de CuSO_4 que fue la que demostró un mejor efecto contra la PL y una menor tasa de mortalidad. Con el mismo tratamiento, después de 6 días de la lesión intraestrial con QUIN se tomaron muestras para una comparación de los niveles de GABA por HPLC.

d) En un tercer grupo de animales con la dosis seleccionada de CuSO_4 y después de la lesión con QUIN se recolectaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Con estas muestras se cuantificó la actividad de la ceruloplasmina (Cp).

Dentro de los resultados se puede resaltar que el CuSO_4 atenúa los daños producidos por el QUIN en la PL, además de mantener los niveles de GABA con respecto al control. El Cu también induce la actividad de la Cp en LCR después de la lesión con QUIN; éstos resultados sugieren que el cobre puede estar involucrado en el proceso de bloqueo de receptores para NMDA, actuando como un antagonista para estos receptores, o quizás pueda reaccionar con el QUIN de tal forma que se presente una inhibición de tipo no competitivo además de una protección en la formación de RL debido a que aumenta la actividad de la Cp. Lo que es evidente es que los daños bioquímicos producidos por el QUIN se ven atenuados por el tratamiento agudo con CuSO_4 .

TABLA DE ABREVIATURAS

AAE	Amino ácidos excitadores
Ach	Acetilcolina
AK	Ácido Kaínico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolil propiónico
APB	Ácido fosfonobutírico
APH	Ácido-2-amino-5-fosfonoheptanoico
APV	Ácido-2-amino-5-fosfonovalerico
ANOVA	Análisis de Varianza
Asp	Aspartato
ATP	Adenosin trifosfato
Cu	Cobre
SNC	Sistema Nervioso Central
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
Cp	Ceruloplasmina
DA	Dopamina
DTT	Ditiotreitol
EH	Enfermedad de Huntington
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FMN	Flavin adenin mononucleótido
GABA	Ácido γ -amino butírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
Glu	Ácido Glutámico
GSH	Glutati3n reducido
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
htt	Gen de la Huntingtina
IBO	Ácido Iboténico
i.p.	Intra peritoneal
i.v.	Intravenosa
i.e.	Intra estriatal

KYN	Kinurenina
KYNA	Ácido Kinurénico
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAO	Monoamino oxidasa
MDA	Malondialdehído
MK-801	Dizocilpina
NA	Noradrenalina
NBQX	2,3-dihidro-6-nitro-7-sulfamoiil-benzoquinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
3-NP	Ácido 3-Nitropropiónico
SON	Sintasa del óxido nítrico
OH•	Radical Hidroxilo
PL	Peroxidación de lípidos
PLF	Productos lipídicos fluorescentes
QUIN	Ácido quinolínico
ROS	Especies Reactivas al Oxígeno
Redox	Reacción de Oxido-reducción
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SOD	Superóxido dismutasa
S.S.I.	Solución salina isotónica
UV	Ultra violeta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Vis.	Visible

INTRODUCCIÓN

LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Características generales de la enfermedad

Esta enfermedad, que se distingue por la tríada de herencia dominante, coreoatetosis y demencia, conmemora el nombre de George Huntington. Huntington describió la enfermedad en un grupo de emigrantes ingleses de Long Island y se creía que la limitante dependía de los ancestros (Joynt y cols., 1990). Huntington ofreció una descripción sucinta y gráfica de la enfermedad que basó en observaciones de los pacientes que su padre y abuelo habían atendido durante su ejercicio profesional en East Hampton. En 1872 George Huntington describe la corea hereditaria en un discurso ante la **Meigs and Mason Academy of Medicine** y que se publicó más tarde en *Medical and Surgical Reporter* (Raymond 1999):

"Esta es entendida generalmente por todos los síntomas de corea común solo en un grado exagerado, casi siempre se manifiesta hasta la vida adulta o intermedia y comienza gradualmente por seguros y graduales incrementos. Cuando ellos o algunos parientes mostraron manifestaciones de la enfermedad y más especialmente cuando estas manifestaciones fueron de naturaleza grave, uno o más de los descendientes casi invariablemente sufrirán por la enfermedad si ellos viven hasta la edad adulta. La tendencia de locura y en algún tiempo esa forma de locura conduce marcadamente al suicidio. A medida que la enfermedad progresa, la mente comienza más o menos a perjudicarse, provocando una mayor cantidad de demencia deteriorando el cuerpo y la mente gradualmente hasta la muerte, relevándolos de su sufrimiento (tomado de Joynt y cols., 1990)".

Actualmente se sabe que la enfermedad de Huntington (EH), como actualmente se le conoce, es un desorden degenerativo, caracterizado por daño cognoscitivo, disturbios emocionales y movimientos involuntarios de tipo corea se

presentan principalmente entre la tercera y quinta década de vida del paciente (Jenkins y cols 1993), causado por una expansión de más de 40 repeticiones del trinucleótido CAG en un gen de herencia autosómico dominante localizado en el brazo corto del cromosoma 4, llamado IT15 (ver Fig. 1), que codifica para una proteína de 348 kDa llamada huntingtina (htt), y de cuya longitud depende la edad de iniciación de los síntomas (Gusella y cols., 1983; Brouillet y cols., 1999).

Mapeo genético del cromosoma 4

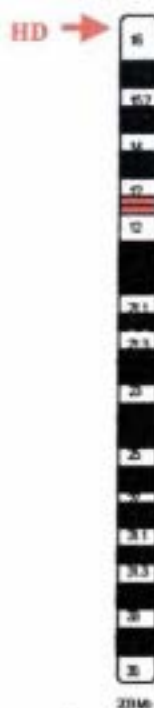


Fig. 1 Se muestra el mapeo genético del cromosoma 4, ilustrando el locus responsable de la EH. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/SCIENCE96/chr74>

Los pacientes que padecen esta enfermedad tienen una sobrevida de 20 años en promedio después de la aparición de los primeros síntomas (Raymond 1999). La prevalencia en el ámbito mundial se estima de 5-10 casos por cada 100,000 personas. La presencia de la EH es alta en el oeste de Escocia. En la región del lago Maracaibo en Venezuela hay una prevalencia de 1,000 a 7,000

casos por cada 100,000 personas y en ciertos grupos étnicos tales como los japoneses y los afroamericanos, el número de casos reportados es bajo. Se especula que la presencia de la enfermedad en estas zonas se deba a algunos factores, tales como los patrones de migración de las poblaciones, el aislamiento geográfico y los factores genéticos (Hayden, 1981; Conneally, 1984).

Características histopatológicas

La apariencia general del cerebro de los pacientes que mueren a consecuencia de la EH es anormal. Usualmente el tamaño del cerebro es pequeño y con atrofia visible media a moderada de la corteza cerebral, preferencialmente en los lóbulos frontales y parietales (ver Fig 2). En muchos casos, el peso normal del cerebro disminuye de un 20 a 30 %. La atrofia característica del caudado putamen (conocido como cuerpo estriado) se asocia a la dilatación de los ventrículos laterales. Se ha observado que el caudado-putamen es el mayor sitio de patología del la EH donde el 90 % de las neuronas están dañadas y hay una vulnerabilidad diferencial en la población neuronal; es decir, que hay preferencia por las neuronas estriatales espinosas medianas (Beal, 1986). En contraste, las neuronas no espinosas largas y las neuronas espinosas no largas están protegidas (Ferrate y cols., 1993).

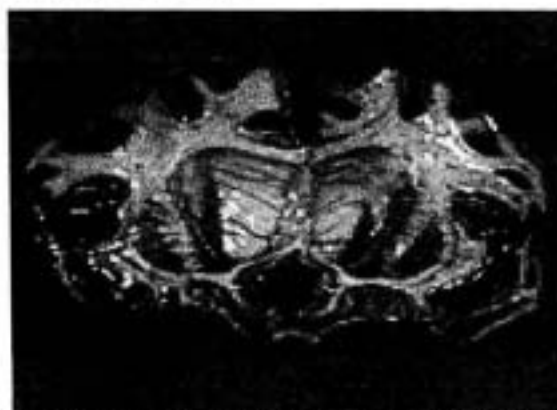


Fig. 2 Corte de cerebro de un paciente con EH, que muestra una dilatación de los ventrículos y atrofia del núcleo caudado. Crédito de imagen: Kevin Roth and Robert Schmitz, Washington University, St. Louis, MO, USA. Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/obj-bin/SCIENCE96/ldr74>

Características histopatológicas

Se han analizado las concentraciones de dopamina (DA), GABA, acetilcolina (Ach), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), sustancia P, colecistoquinina (CCK), metenceflina, neuropéptido Y y somatostatina, entre otras sustancias y neurotransmisores que están presentes en el cuerpo estriado de enfermos con EH y que se utilizan como marcadores de neuronas estriales. Los resultados fueron variados ya que se han reportado cambios en los niveles de éstos.

Tabla 1 Cambios en las concentraciones de algunas moléculas en la EH

Molécula	Concentraciones en estriado en EH	
DA	Cambios pequeños o nulos	Spokes, 1980; Carrasco, 1986; Bird 1980.
GABA	Disminuye hasta un 60 % y la actividad de la GAD se encuentra disminuida	Bird, 1974; Schwarcz, 1984.
Ach	Se encuentra una disminución de la enzima Acetilcolintransferasa	Schwarcz, 1984; McGeer y cols, 1973
NA	Normales o relativamente aumentados	Spokes, 1980
5-HT	Las concentraciones estriales de 5-HT permanecen normales o ligeramente aumentadas, mientras que en el líquido cefalorraquídeo permanecen normales .	Schwarcz, 1984
Sustancia P	Es un neuropéptido encontrado en los ganglios basales, postulado como neurotransmisor excitador de la vía eferente del estriado a la sustancia nigra, y se ha encontrado que en la EH está disminuido .	Gale, 1978
CCK	Este péptido se encuentra disminuido en los ganglios basales de enfermos coreicos, especialmente en <i>globus pallidus</i> y la <i>sustancia nigra</i> .	Reiner y cols, 1988
Metencefalina	En el neostriado la metencefalina se encuentra marcadamente disminuida	Reiner y cols, 1988; Aroni, 1983
Somatostatina y neuropéptido Y:	En la EH las concentraciones de somatostatina y neuropéptido Y en el cuerpo estriado se encontraron aumentadas hasta tres veces más de lo normal.	Beal 1986; Dawbarn col. 1985; Perkins y cols., 1983

Etiología de la EH

A pesar del descubrimiento del gen de la EH, aun no se ha encontrado la etiología de la enfermedad, existen varias hipótesis que tratan de explicar la neurodegeneración existente en esta enfermedad, sin embargo ninguna es del todo convincente, y además no son excluyentes entre sí, por lo que se cree que más de una podría estar participando dentro de la degeneración que se presenta en esta enfermedad. Recientemente se ha postulado que la pérdida de función de la *htt* mutada puede estar asociada con la patogénesis de la enfermedad (Cattaneo y cols., 2001). Sin embargo, estos datos sugieren que un bloqueo o

represión de la expresión del alelo expandido puede no ser suficiente para detener todos los mecanismos patológicos involucrados en al EH.

Otro factor asociado puede ser la expresión del receptor mGluR5 (Receptor metabotrópico a glutamato) que se presenta en las neuronas espinosas medianas, conduciendo esto a una susceptibilidad de estas neuronas a un daño excitotóxico (Testa y cols., 1995). Otro proceso involucrado con la EH es la disfunción mitocondrial, por lo que éste ha sido utilizado para crear algunos modelos experimentales de la enfermedad. Existen hipótesis que involucran la acción de una toxina producida por alteraciones en procesos metabólicos durante el desarrollo de la enfermedad. Se ha postulado que cambios en el metabolismo del triptofano pudieran estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad (Beal y cols., 1986; Reynolds, y cols., 1988; Perkins y cols., 1983); debido al metabolismo del L-triptofano por la vía de la kinurenina, se sintetizan como metabolitos el ácido quinolínico (ácido 2,3-piridindicarboxílico, QUIN) y el ácido kinurénico (KYNA) ambos productos de la kinurenina (KYN).

Receptores glutamatérgicos

La hipótesis de la participación de los receptores glutamatérgicos en la muerte neuronal asociada a las enfermedades neurodegenerativas fue originalmente propuesta por Olney y col., (1986) con esto la disfunción de las vías glutamatérgicas se ha implicado en varios desórdenes neurodegenerativos del Sistema Nervioso Central (SNC) tales como algunos casos de epilepsia (Fisher, 1991), la EH (Albin 1990), la enfermedad de Parkinson (Turski, 1991), el complejo SIDA-demencia (Lipton, 1991) y la enfermedad de Alzheimer (Jansen, 1990). Además, los receptores glutamatérgicos están involucrados en la iniciación y propagación de las crisis convulsivas epileptogénicas, debido a una activación excesiva de ellos, obteniéndose como resultado una muerte neuronal masiva que puede ocurrir también durante los periodos de isquemia e hipoglucemia (Choi, 1995; Fisher, 1991)..

En general, esta hipótesis propone que la muerte neuronal es causada por la concentración excesiva de uno o varios agonistas endógenos de los receptores para aminoácidos excitadores AAE, incluyendo a los ácidos glutámico y aspártico, los neurotransmisores que clásicamente activan estos receptores (Nicol, 1990).

Los primeros receptores glutamatérgicos caracterizados fueron aquellos asociados a canales iónicos selectivos a cationes, también llamados receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Sperk, 1992). Posteriormente, gracias a estudios electrofisiológicos, se propusieron tres tipos diferentes de receptores glutamatérgicos (ver fig. 3) que se denominaron inicialmente como: kainato, quisqualato y NMDA, refiriéndose a su ligando farmacológico preferente. También se propuso un cuarto grupo: receptores presinápticos afines al derivado fosfonato del glutamato, ácido fosfonobutírico (APB) (Choi, 1995, De Deyn y cols. 1992; Westbrook, 1994). Se postuló que las tres primeras clases de receptores están unidos a canales catiónicos de membrana (Westbrook, 1994). Por lo tanto, los receptores para AEE pueden clasificarse en tres subtipos generales:

- 1) Receptores ionotrópicos para NMDA.
- 2) Receptores no NMDA (AMPA y Kainato)
- 3) Receptores metabotrópicos

Los receptores a NMDA son los receptores glutamatérgicos más conocidos, están acoplados a canales catiónicos modulados por Mg^{2+} ; el Mg^{2+} extracelular bloquea los incrementos de Ca^{2+} en respuesta al estímulo de receptores NMDA de manera voltaje dependiente, por lo que se necesita una despolarización persistente de la membrana para que se lleve a cabo la apertura del canal; también se caracterizan por su alta conductancia y permeabilidad a Ca^{2+} y al Na^+ .

Este tipo de receptores juegan un papel crucial en las funciones cognitivas, así como en diversos procesos patológicos ya que hay una mayor densidad de éstos en el hipocampo, siguiéndole la neocorteza, el cuerpo estriado, el tálamo, y en las terminales dopaminérgicas nigroestriatales (Martínez-Fong, 1992). En el cuerpo estriado los receptores a NMDA se encuentran en las células espinosas,

las cuales en la EH son las más susceptibles a la muerte (Choi, 1988; De Deyne, 1992; Wesbrook, 1994).

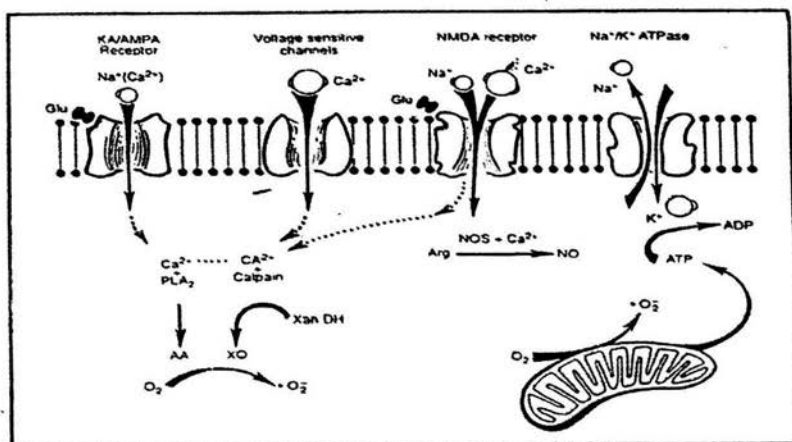


Fig.3 PROCESOS MEDIADOS POR RECEPTORES DE GLUTAMATO, QUE CONTRIBUYEN AL ESTRÉS OXIDATIVO. Cuando el receptor es activado, el canal de calcio asociado cambia su conformación incrementando la permeabilidad para este ión, produciendo así una señal propagable. Cuando grandes concentraciones de calcio invaden el citosol celular, se generan eventos tóxicos entre los cuales destacan cambios drásticos en el metabolismo energético de la célula, alteraciones en la fosforilación oxidativa, activación de lipasas y proteasas, generación de radicales libres, estrés oxidativo y finalmente muerte celular. (Coyle T.J. y Puttarken P. Science vol 262 689-695,1993)

Los receptores a NMDA se pueden activar selectivamente por varios compuestos endógenos que incluyen al L-aspartato, el homocisteato y el QUIN, requiriéndose el coagonismo de la glicina. La acción del glutamato se puede antagonizar selectivamente de manera competitiva por el 2-amino-5-fosfonovalerato (APV) y el 2-amino-5-fosfonoheptanoato (APH), o no competitivamente por fármacos que se unen al sitio fenciclidínico dentro del canal abierto, como son: la fenilciclidina, la dizocilpina o MK801, el dextrorfan, la ketamina (Choi, 1998; Wesbrook, 1994) y por el bloqueo de la unión del coagonista glicina realizado por kinureninas.

Estrés oxidativo y efectos Bioquímicos

El estrés oxidativo puede ser definido como un estado en el cual la exposición a radicales libres u otros oxidantes induce a cambios en las funciones normales o en la sobrevivencia misma de las células (Santamaría, 1995). Existe una hipótesis que explica el daño oxidativo acumulativo, asociado con un retraso

principal y progresivo en esas condiciones, así como evidencias acerca de que la activación excesiva de los receptores glutamatérgicos es una importante fuente de estrés oxidativo (Halliwell, 1984).

Dentro de los efectos de los radicales libres encontramos la reacción y combinación con biomoléculas, originando la degradación peroxidativa de ácidos grasos polinsaturados (peroxidación de lípidos) e interacciones glucosa-proteína o glucosa-lípido (glicación), y modificación oxidativa de aminoácidos (Uchida, 2000). Un gran número de aldehídos reactivos derivados de la peroxidación de lípidos han sido implicados como agentes causales en el proceso citotóxico iniciado por la exposición de sistemas biológicos a agentes oxidantes (Uchida, 2000).

Modelos experimentales de la EH

Con base en las diferentes hipótesis de la etiología de la enfermedad se han diseñado diferentes modelos experimentales para tratar de esclarecer los mecanismos de la enfermedad, en estos modelos se trata de reproducir algunas alteraciones típicas de la enfermedad, como son las características conductuales, histológicas, fisiológicas y bioquímicas. Por tal motivo, se han utilizado moléculas con efecto neurotóxico como el QUIN, el ácido kaínico (AK), el ácido ibótenico (IBO), o moléculas que afectan directamente el metabolismo mitocondrial como el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y el malato que inducen un daño patológico similar al estriado de ratas que se produjo en otro modelo para la EH (Beal y cols 1993, Brouillet y cols 1995). De éstas, destaca el QUIN como mejor modelo experimental para producir las características de la EH, ya que esta neurotoxina es un metabolito que se produce de manera natural en el tejido cerebral, por lo que se ha postulado como un factor en la etiología de la enfermedad (Watkins y Evanns 1981).

En 1986, Beal y cols, realizaron un estudio inmunohistoquímico comparativo entre múltiples sustancias neuroexcitadoras y sus efectos neurotóxicos sobre el cuerpo estriado de la rata, evaluando alteraciones morfológicas y sus perfiles

neuroquímicos de esta región. Se midieron los niveles de somatostatina, neuropéptido Y, sustancia P, vasopresina, GABA y DA después de la administración de los ácidos nicotínico, ftálico, kainico, quinolínico y N-metil-D-aspartato (NMDA) en varias concentraciones. Los ácidos iboténico, kainico, quinolínico, y NMDA redujeron también significativamente la inmunoreactividad a la sustancia P, y los niveles de GABA, como en la enfermedad. Exceptuando al QUIN, las otras tres sustancias disminuyeron la inmunorreactividad a la somatostatina y al neuropéptido Y, contrario a lo que ocurre en la EH (ver Tabla 2).

Sustancia neuroactiva	EH	KA / IBO	QUIN
GABA	↓	↓	↓
Ach	↓	↓	↓
Sustancia P	↓	↓	↓
DA	NC	NC	NC
Somatostatina	↑	↓	NC
Neuropéptido Y	↑	↓	NC

↓ = Disminuye ↑ = Aumenta NC = No cambia
 Tabla 2 Cambios en sustancias y neurotransmisores producidos por diferentes neurotóxicos.

La administración de los tres ácidos (KA, IBO, QUIN) en el cuerpo estriado produjo una zona de necrosis circundada por un área de pérdida total de neuronas. Sólo el QUIN mantuvo intactas a las neuronas que contenían somatostatina y neuropéptido Y, lo cual se atribuyó a la capacidad de dichas neuronas para metabolizar el QUIN (Vincent y cols, 1983) por lo que se postuló que estas neuronas podrían captar el QUIN y metabolizarlo. Después de este estudio, el QUIN se ha considerado como la mejor molécula para reproducir la EH.

Ácido-3-nitropropiónico

Ludoph y cols. (1991) investigaron la participación de toxinas que mimetizan la EH por inhibición de la actividad respiratoria mitocondrial. Estos investigadores encontraron que el 3-NP, una toxina que inhibe el metabolismo energético y que está presente en el ambiente en hongos y plantas, causa daño neural en el SNC.

El mecanismo del daño es a través de la inhibición de la succinato deshidrogenasa, enzima que juega un papel central en la cadena de transporte de electrones y en el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos. Se ha observado que las inyecciones intraestriatales del 3-NP en ratas producen lesiones neurales en forma dosis-dependiente, que se manifiestan con presencia de gliosis y pérdida neural. Las características neuroquímicas del modelo fueron una disminución de GABA, sustancia P, somatostatina, neuropéptido Y y de DA (Brouillet y col., 1993). La administración subaguda provoca desarrollo de movimientos lentos y postura distónica en las ratas. La administración crónica realizada en primates produjo movimientos desordenados parecidos a los que se observan en la EH (Koutouzis y col., 1994 y Brouillet y col., 1993).

Modelos transgénicos

Desafortunadamente, los estudios desde el descubrimiento de la mutación del gen, lejos están de conducir al entendimiento del fundamento de los procesos neurodegenerativos o del descubrimiento de una terapia efectiva, sin embargo, el descubrimiento del gen responsable, así como del producto de expresión, han podido establecer una línea de investigación alterna, la cual se basa principalmente en la manipulación genética de diferentes especies entre las cuales están el modelo en *Drosophila*, *Caenorabditis elegans* y ratón. Cada modelo presenta ventajas y desventajas dado que ninguno puede reproducir completamente la patología humana (Bates y cols 1997; Brouillet y cols 1999; Menalled y Chesselet 2002; Rubinsztein 2002).

Los modelos transgénicos son generados a partir de un gén de un paciente con EH el cual es introducido en ovocitos fertilizados, por varias razones incluyendo el tiempo de expresión de las características fenotípicas y algunas bioquímicas se ha seleccionado al ratón como una especie en la cual se han desarrollado diferentes líneas de transgénicos para diversas enfermedades incluyendo la EH.

Dentro de los modelos desarrollados por este tipo de técnicas están el modelo del cDNA del grupo de Tagle (1998) que expresa el cDNA completo de la htt humana con 16, 48, o 89 repetidos; el modelo transgénico condicionado el cual cuenta con un sistema Tet-off y el promotor CamKII el cual permite regular la expresión del gen (Yamamoto y cols., 1999; Yamamoto y cols., 2000); el ratón Knock-out con mutaciones nulas del gen de la htt (Duyao y cols., 1995; Nsir y cols., 1995; Zeitlin y cols., 1995); y el modelo del exón 1 desarrollado por Mangiarini y cols en 1996 el cual lleva un fragmento de 1.9 kb del DNA que contiene el promotor, el primer intrón y el primer exón de un paciente con EH.

Tratamientos en la enfermedad de EH

Actualmente no existe terapia o cura efectiva que pueda disminuir el deterioro mental y motor que sufren los pacientes con EH (McMurray, 2001) pero existen diferentes estrategias terapéuticas para disminuir los síntomas ocasionados por la enfermedad, así como el consejo genético para los afectados por esta. Con base en las diferentes hipótesis para tratar de explicar la fisiopatogénesis de esta enfermedad, se han diseñado una serie de estrategias que lleven al alivio o detención del progreso de la enfermedad.

Antioxidantes y moléculas atrapadoras de radicales libres

Se han utilizado varios compuestos que pueden disminuir la formación de radicales libres, los cuales son los que más se ha estudiado y desarrollado en los últimos años.

Un enfoque interesante para la prevención del daño neuronal es la inducción de la síntesis de una proteína neuroprotectora: la metalotioneina. Esta proteína tiene en su estructura un tercio de residuos de cisteína y a través de estos procesos posee alta afinidad por los radicales hidroxilo (Sato y Bremner., 1993), los metales de transición (Kagi y Schaffer, 1988) y aún el óxido nítrico (Schwarz,1995) por lo que es una opción interesante poco explorada de tratamiento neuroprotector .

El desarrollo de nuevos y potentes antagonistas farmacológicos para receptores a AAE se ha empleado en EH, entre otros padecimientos neurodegenerativos, como el clorhidrato de remacemida (Schilling y cols., 2001; Ferrante y cols., 2002). Debe resaltarse la investigación que se ha realizado con los antagonistas de los receptores a NMDA, que parecen mediar una protección efectiva en todos los modelos experimentales de neurodegeneración. Un problema con estos últimos antagonistas es que pocos de ellos logran atravesar la Barrera Hematoencefálica y los que lo hacen provocan eventos neurotóxicos (Sagrattella 1995).

Restablecimiento de la fosforilación oxidativa

Es quizás la alternativa menos investigada y consiste en administrar sustancias que aumenten la eficacia de la fosforilación oxidativa. La coenzima Q₁₀, por ejemplo, es un componente esencial en la cadena de transporte de electrones en donde funciona tanto como aceptor como donador (Przyrembel, 1987). Se ha propuesto que la coenzima Q₁₀ puede subsanar un defecto en la cadena de transporte de electrones y se ha empleado con éxito en la prevención del daño neuronal en la EH (Schilling y cols., 2001; Ferrante y cols., 2002) así como el ácido taurodesoxicólico (Keene y cols., 2002), sin embargo, se ha observado una mejora limitada en pacientes.

Transferencia de Genes al Sistema Nervioso (SN).

La introducción de material genético nuevo al SN es una técnica relativamente nueva que promete tener grandes resultados, sobre todo para la corrección de defectos del DNA que producen trastornos neurológicos. Inicialmente, el envío de genes al cerebro se realizó mediante el trasplante de células periféricas modificadas *in vitro* hacia el cerebro (Fisher y Ray, 1994). Los resultados de estos estudios indicaron que las células transplantadas sobrevivían y eran funcionales. Recientemente, se han desarrollado otras estrategias como son:

- a) Transferencia usando vectores retrovirales (Frim, 1993).

- b) Inyección de RNA mensajero (Maciejewski-Lenoir, 1993)
- c) Tecnología antisentido. (Stein, 1993)

GANGLIOS BASALES (NÚCLEOS CEREBRALES)

Consideraciones Anatómicas y Fisiológicas

En estados de salud, las actividades de los ganglios basales y del cerebro están mezcladas con los sistemas corticoespinal y corticomesecefaloespinales. Las actividades posturales estáticas del primer sistema son indispensables para los movimientos voluntarios del último (Joynt 1990).

Los ganglios basales (núcleos cerebrales) son masas que se encuentran en partes de materia gris en cada hemisferio cerebral (Fig 4 y 5) (Tortora 1998). El mayor de los ganglios basales de cada hemisferio es el cuerpo estriado (*corpus* = cuerpo; *striatum* = estriado). Está formado por el núcleo caudado (*cauda* = cola) y el núcleo lentiforme (*lenticula* = con forma de lente o lentes). El núcleo lentiforme se divide en una porción externa que se llama putamen (*putamen* = corteza) y una porción medial que se llama globus pallidus (*globus* = balón; *pallid* = pálido) (Tortora 1998). Otras estructuras que con frecuencia se consideran parte de los ganglios basales son la sustancia nigra, el núcleo subtalámico, y el núcleo rojo (Tortora 1998).

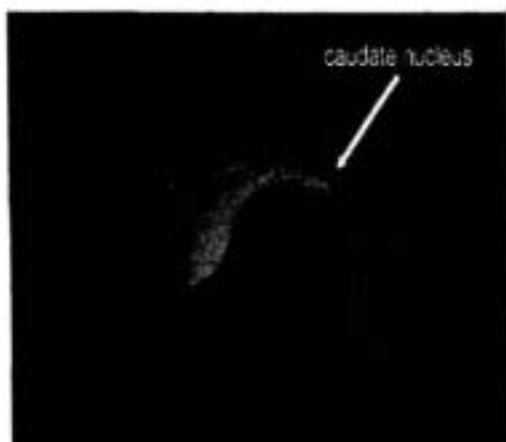


Fig. 4 se muestra la localización del núcleo caudado en un corte de cerebro humano en un corte sagital

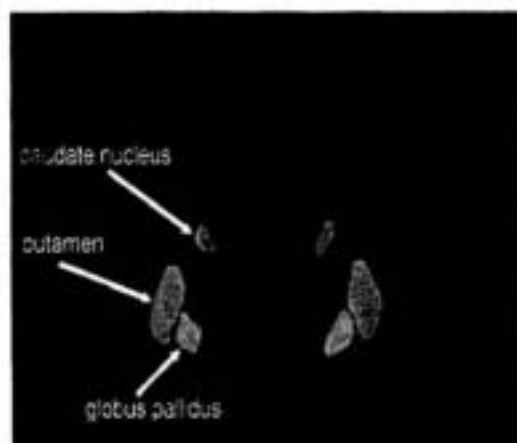


Fig. 5 Se muestra un corte coronal del cerebro Humano, señalando la anatomía de los ganglios basales

Los ganglios basales se interconectan por medio de muchas fibras. También se conectan con la corteza cerebral, tálamo e hipotálamo. El núcleo caudado (cuerpo estriado) y el putamen controlan los movimientos subconscientes más importantes de los músculos esqueléticos (Tortora 1998). El cuerpo estriado, que es la parte receptora de los ganglios basales, recibe fibras organizadas de manera topográfica provenientes de todas partes de la corteza cerebral. Denny-Brown y Yanagisawa, quienes estudiaron los efectos de la resección de estructuras piramidales individuales en el macaco, concluyeron que los ganglios basales funcionan como cierta clase de centro distribuidor en el que, durante un movimiento intentado o proyectado, se facilitan las actividades de un grupo y se suprimen todas las otras que son innecesarias (Tomado de Raymond 1999). Un aspecto de importancia máxima de la estructura y función de ganglios basales, que sólo se apreció hace poco, es la falta de equivalencia de todas las partes del cuerpo estriado. Hay tipos de células y zonas celulares en particular dentro de esta estructura que parecen tener funciones receptoras y ejecutivas diferentes (Raymond 1999), por lo que se han delineado dos sistemas principales de fibras estriatopalidales:

- 1) Una vía directa estriatomedial palidonigral (parte reticulada), a la que activan las proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza

sensitivo-motora y proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales (parte compacta)

- 2) Un circuito estriatolateral, palidosubtalamosmedial y palidonigral indirecto. Este último, en contraste con la acción excitatoria de la vía directa, utiliza a un mediador dopaminérgico que es inhibitorio (Raymond 1999).

Consideraciones Farmacológicas

Aunque los fisiólogos fracasaron durante años para descubrir las funciones de los ganglios basales en sus experimentos de estimulación y resección burda, los clínicos se percataron de que el empleo de ciertos fármacos, como la reserpina y las fenotiacinas, producían con regularidad síndromes extrapiramidales (parkinsonismo, coreoatetosis, distonía). Estas observaciones estimularon en gran medida el estudio de sustancias transmisoras en el SNC (Tomado de Raymond 1999). Se trata de sustancias sintetizadas y almacenadas en las terminaciones presinápticas y descargadas, como reacción a estímulos apropiados, a través de las hendiduras sinápticas para combinarse con sitios receptores específicos sobre la célula posináptica (Pearson cols., 1990).

La opinión actual consiste en que el control ganglionar basal integrado de los movimientos se puede entender mejor si se consideran, en el contexto de la anatomía, los efectos fisiológicos de los neurotransmisores que envían señales entre la corteza, el cuerpo estriado, el globo pálido, el núcleo subtalámico, la sustancia nigra y el tálamo (Raymond 1999).

Las sustancias neurotransmisoras más importantes desde el punto de vista de la función ganglionar basal son glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, acetilcolina, y serotonina. Sustancia P y encefalina desempeñan funciones subsidiarias en las vías del GABA (Raymond 1999). El glutamato, es probablemente, el neurotransmisor de las proyecciones corticoespinales excitatorias y de las neuronas excitatorias del núcleo subtalámico. El GABA es el

neurotransmisor (inhibitorio) de las neuronas estriatales de proyección, del globo pálido y de la sustancia negra (parte reticulada) Fig. 6 (Raymond 1999).

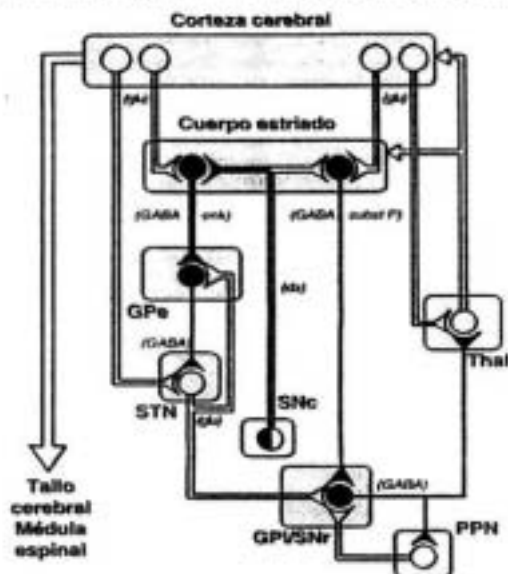


Fig. 6 Esquema de las vías trasnisoras principales y sus efectos sobre los circuitos corticobasales. Los círculos y líneas de color negro indican neuronas con efectos excitatorios y los círculos y líneas más claros indican influencias inhibitorias. Se cree que el segmento interno (medial) del Globo pálido (GPi) y la zona reticulada de la sustancia negra (SNr) actúan como una entidad que se proyecta a través de neuronas que contienen GABA hacia el tálamo (núcleos ventrolaterales y ventrolaterales) y hacia los núcleos pedunculopontinos (PPN). Las neuronas dopaminérgicas que se originan en la parte compacta de la sustancia negra (SNc) tienen influencia excitatoria sobre una porción del cuerpo estriado, y un efecto inhibitorio sobre la porción del cuerpo estriado que se proyecta hacia la parte externa (lateral) del globo pálido(GPe) y el núcleo subtalámico (STN). Sustancia P y encefalina actúan como neurotransmisores moduladores para GABA en las vías que se proyectan desde el cuerpo estriado. (glu = glutamina; DA = dopamina). (Trends Neurosci 13:266, 1990)

Consideraciones Patológicas

En 1919, Wilson describió por primera vez con bases clínicas, y demostró así, al síndrome motor extrapiramidal que se conoce en la actualidad. En la enfermedad que ahora lleva su nombre, y que él llamó degeneración hepatolenticular, la anomalía más sobresaliente en el Sistema Nervioso (SN) era una degradación de ambos putámenes a veces hasta el punto de la cavitación (Raymond 1999).

Los estudios clínico-patológicos de la Enfermedad de Huntington, a partir de los de Meyner (1871) y seguidos por los de Jelgersmas (1908) y Alzheimer (1911),

relacionan el trastorno de los movimientos lo mismo que la rigidez con pérdida de células nerviosas en el cuerpo estriado (tomado de Raymond 1999).

Inyecciones de un antagonista de GABA, bicuculina, en la porción palidum lateral de primates produce corea. La inyección similar en el estriado no fundamenta el resultado en corea, excepto cuando ocurre una difusión del palidum adyacente (Bird 1980). En 1920, Oskar y Cecile Vogt ofrecieron una descripción detallada de los cambios neuropatológicos en varios pacientes que habían estado afligidos por coreoatetosis desde la primera infancia (Klatzo 2003). Tretiakoff en 1919 fue el primero en demostrar la afección sostenida de la sustancia nigra en los casos de parálisis agitante (Raymond 1999).

En la tabla 3 se resumen las correlaciones clinicopatológicas aceptadas por la mayoría de los neurólogos, pero debe insistirse una vez más que hay aún mucha incertidumbre en cuanto a los detalles más finos (Raymond 1999).

Tabla 3 Tomada de Principios de neurología (Adams, Victor, Ropper 6ª edición)

Correlaciones clinicopatológicas de los trastornos motores extrapiramidales	
Síntomas	Localización principal de la anomalía motora
Rigidez plástica unilateral con temblor estático (Síndrome de Parkinson)	Sustancia nigra contralateral más otras estructuras mesoencefálicas
Hemibalismo y hemicorea unilaterales	Núcleo subtálámico de Luys contralateral o conexiones entre el núcleo de Luys y el globo pálido
Corea crónica de tipo de Huntington	Núcleo caudado y putamen
Atetosis y distonias	Cuerpo estriado contralateral no se conoce la patología de la distonias muscular deformante (Oppenheim)
Incoordinación cerebelosa temblor de intención o hipotonía	Hemisferio cerebeloso ipsilateral parte media inferior del pedúnculo cerebeloso ipsilateral; brazo conjuntivo (ipsilateral si está por debajo de la decusación, contralateral si está por arriba)
Rigidez de descestración. Es decir extensión de los brazos y las piernas opostótonas	Por lo general bilateral en el segmento de la parte alta del tallo cerebral, a nivel del tallo rojo o entre éste y los núcleos vestibulares
Micoclonos palatino y facial (rítmico)	Fascículo tegmentario central ipsilateral, con deservación del núcleo olivar inferior y del núcleo ambiguo
Micoclonos difusos	Degeneración neuronal, por lo general difusa o predominantemente en las cortezas o cerebelosas y los núcleos dentados

En términos amplios, los trastornos motores se pueden considerar constituidos por déficit funcionales primarios (o síntomas *negativos*) y efectos secundarios (o síntomas *positivos*), estos últimos atribuidos a la descarga o a la desinhibición de la actividad de partes no lesionadas del Sistema Nervioso Motor (Raymond 1999). Como los déficits primarios o síntomas negativos aparecen bradicinesia y acinesia y pérdida de los reflejos posturales normales, temblor, rigidez y movimientos involuntarios (corea, atetosis, balismo y distonía) como los positivos (Raymond 1999).

LA VÍA DE LA KINURENINA

Esta vía ha sido descrita tanto en hígado como en cerebro de; humanos, primates no humanos, roedores y mamíferos menores (Stone 1993). No fue sino hasta 1947 que la vía de la kinurenina (ver fig. 7) fue reconsiderada como una mejor ruta para la transformación del triptofano periférico a nicotinamida (NAD) y sus nucleótidos conjugados en el metabolismo de mamíferos (Beadle y col. 1947).

Interesantemente, la importancia de vía de la kinurenina se centro durante largo tiempo en su función como generadora de NAD y como una mejor vía de distribución en casos de deficiencia de piridoxina, esta vitamina es un cofactor esencial en varias enzimas kinurénicas (Stone, 1993). Con el descubrimiento de que las neuronas y otras células liberan 5-hidroxitriptamina (5HT) como un neurotransmisor o una hormona local respectivamente, el interés de más farmacólogos y neurocientíficos regresó al estudio del triptofano como un precursor de 5HT (Peters, 1991). Esta situación persiste con el descubrimiento del QUIN y el KYNA, dos metabolitos del triptofano formados en esta vía, en altas concentraciones en el hígado y que han mostrado un pronunciado efecto en la actividad neuronal, mostrando actividad en los receptores para aminoácidos excitadores (AEE) de neuronas centrales (Stone y Perkins, 1981; Perkins y Stone, 1982, 1983 a y b).

En el hígado, la primera reacción es una oxidación y apertura en el anillo indólico del triptofano, la cual es realizada por la enzima triptofano 2,3-dioxigenasa TDO (también conocida como triptofano pirrolasa) la cual se encuentra

principalmente en tejidos periféricos y tienen una especificidad por el sustrato L-triptofano. La TDO depende de los niveles del grupo hemo, tiene un peso molecular de 47796 y un tiempo de vida media de aproximadamente 2 horas en los mamíferos, y su actividad es rápidamente modificada por la disponibilidad del sustrato (Bender, 1989).

La administración del triptofano, induce fuertemente la actividad de la TDO por un mecanismo aparentemente no dependiente de RNA y síntesis de proteína, a un nivel en el cual gran parte del triptofano periférico es metabolizado por ruptura de su estructura y una pequeña porción está disponible para su penetración al SNC y su subsecuente metabolismo hacia la serotonina o las kinureninas. La consecuencia de dichos procesos es una profunda disminución de los derivados del indol del triptofano en el SNC (Stone, 1993). La actividad de la TDO puede también ser inducida por glucocorticoides en un mecanismo que involucra la inducción de la síntesis del RNAm y de proteínas (Salter y Pogson, 1985).

Con base en que la TDO es activa solo sobre el metabolismo del L-triptofano, la administración sistémica de este aminoácido resulta en la producción de L-kinurenina por la formación previa de la N-formilkinurenina (Higuchi y Hayaishi, 1967). La enzima responsable de esto es también hemodependiente: la indolamina dioxigenasa (IDO). Esta enzima también depende de superóxido, y su actividad es regulada por la presencia de radicales libres generados por los varios sistemas, tales como el ascorbato, el azul de metileno y la xantina-xantinaoxidasa, pudiendo ser inhibida por la superóxido dismutasa (Hirata y Hayaishi, 1971). La IDO es también activada para metabolizar el L-triptofano y el L-5-hidroxitriptofano, la triptamina, la 5HT y la melatonina (Hirata y Hayaishi, 1971). Mientras que la TDO está presente en el hígado, la IDO está ausente en el mismo, pero presenta una amplia distribución en los tejidos intestinales, la placenta y particularmente en el cerebro de los mamíferos. Especialmente en el cerebro de la rata la enzima muestra una gran actividad en el hipotálamo (Gal y Sherman, 1980 en Stone, 1993).

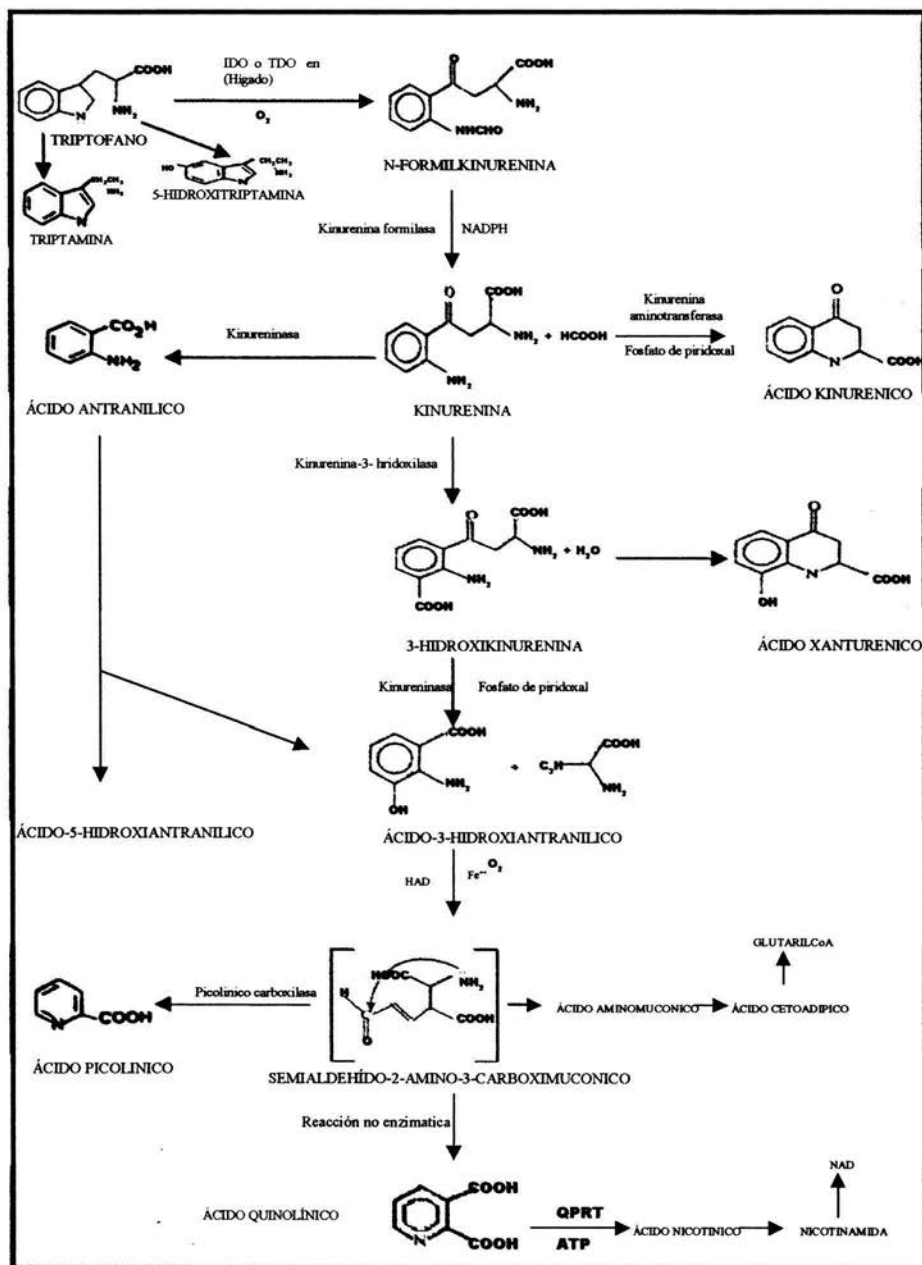


Fig. 7 VÍA DE LA KINURENINA Y ENZIMAS RELACIONADAS. IDO, indolamina 2,3- dioxigenasa; TDO, Triptofano 2,3-dioxigenasa; HAD, 3-hidroxi-antranilato-3,4-dioxigenasa; QPRT, Quinolatofosforribosiltransferasa (Modificada de John F. Reinhard, jr. Y col.; *Advances in Pharmacology*, vol 30, 85-127,1994)

Kinureninasa y kinurenina hidroxilasa

La kinurenina hidroxilasa es la enzima que transforma la kinurenina a 3-hidroxi-kinurenina, aunque la actividad de la kinurenina hidroxilasa también aparece en el cerebro, debido a que esta actividad es reducida con respecto a la de hígado, surgen algunas interrogantes acerca de la habilidad del cerebro de metabolizar sus propias kinureninas a lo largo de ésta vía, desde 3-hidroxi-kinurenina hasta el ácido 3-hidroxiantranílico. Sin embargo, ahora se sabe que la kinureninasa es también capaz de hidrolizar la L-kinurenina a ácido antranílico (Bender y Mc Creanos, 1982), y como consecuencia puede inducir hidroxilación sobre los ácido 3- o 5-hidroxiantranílicos, lo cual explica la habilidad del cerebro para formar 3-hidroxiantranilato que a su vez puede entrar con facilidad al cerebro, constituyendo una alternativa para la activación de la vía, siendo este proceso independiente de la presencia de triptofano (Stone, 1993).

Kinurenina aminotransferasa

Otra alternativa para la L-kinurenina es la conversión de la L-kinurenina a KYNA la cual ocurre por una transaminación irreversible (Kido, 1984; Noguchi, 1991) catalizada por una enzima que se encuentra principalmente en la fracción mitocondrial astrocítica del cerebro de los mamíferos: la L-kinurenina aminotransferasa, sugiriendo que la vía de la kinurenina se lleva a cabo preferencialmente en la glia (Okuno, 1991) y no en las neuronas, lo que ha permitido postular que la secreción del KYNA ocurre desde las células gliales que están en inmediata vecindad, hacia ciertos contactos sinápticos específicos, en el espacio extracelular. Cabe señalar que ésta es una enzima altamente selectiva por su sustrato (la L-kinurenina), en comparación con su baja afinidad por el L-triptofano, el L- α -glutamato y el L-aminoácido, los cuales compiten pobremente por la enzima (Turski y col. 1989 en Stone, 1993).

3-Hidroxiantranilato oxigenasa

La conversión de 3-hidroxiantranilato (3-HA) a QUIN está regulada por la enzima hepática 3-hidroxiantranilato oxigenasa (3-HAO), involucrando la

producción inicial de semialdehído aminocarboximucónico, con el paso de una ciclización no enzimática del QUIN (Long y col. 1954). Otra enzima inapropiadamente llamada picolínico carboxilasa, descarboxila este intermediario a semialdehído aminomucónico. El último paso de una ciclización no enzimática puede suceder con la formación del ácido picolínico (Cook y Pogson, 1983; Heyes y col. 1988). Esta confirmada la existencia de la 3-HAO en el cerebro de mamíferos, en la fracción citoplásmica soluble. La actividad de esta enzima no se ve afectada en presencia de varios aminoácidos excitadores, ni de triptofano y ácido kinurénico, aún en presencia de los dos juntos (Foster y col. 1986).

Ácido quinolínico fosforribosil transferasa

La ácido quinolínico fosforribosil transferasa o QPRT cataliza la condensación del quinolinato y la fosforribosil pirofosfato hasta la descarboxilación del intermediario conjugado de ácido nicotínico mononucleotido. La QPRT aparece en varias isoformas dependiendo del tejido en donde se encuentre, las enzimas detectadas en cerebro, hígado y riñón presentan diferente movilidad electroforética, así como propiedades moleculares diferentes al reaccionar con anticuerpos. La enzima puede ser inhibida por varios compuestos relacionados con el quinolinato (Okuno y Schwarcz, 1985).

En el SNC, la QPRT fue originalmente localizada en la parte final del nervio dentro de la fracción sinaptosomal, aumentando la especulación de que ésta tenía una función primaria como potencial neuromodulador del papel del QUIN presente en el espacio extracelular y la activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Foster y col. 1985). Por tal motivo se considera que esta enzima afecta los niveles del QUIN. Sin embargo, la actividad de la enzima en el cerebro es menor que otras enzimas de la vía hepática de la kinurenina (Stone, 1993).

La farmacología de las enzimas metabolizantes de las kinureninas no ha sido estudiada a profundidad, pero se sabe que muchas de éstas son afectadas por un gran número de antibióticos, y agentes psicotrópicos, así como por

estrógenos (Mostafa y col. 1982). La vía de la kinurenina puede ser manipulada por la nicotinalanina, un análogo de la L-kinurenina. Originalmente fue reportado como un inhibidor potencial de kinunerinasa y kinurenina hidroxilasa (Decker, 1963) demostrando que es capaz de elevar el contenido cerebral de KYNA, a expensas de la disminución de QUIN (Moroni y cols., 1991).

En ratones con elevadas concentraciones cerebrales de KYNA, la nicotinalanina muestra un efecto protector, suprimiendo las convulsiones inducidas por pentilentetrazoles o electroshock, aunque se requieren concentraciones relativamente altas (Connick y col., 1992), constituyendo así, una alternativa, en el desarrollo de análogos de esta vía para emplearlos en los casos donde se obtiene una alta concentración de quinolinato, como ocurre en algunas infecciones virales.

Kinureninas en el cerebro

Los primeros estudios acerca de la bioquímica de las kinureninas se situaban en tejido periférico. Aunque la actividad de la TDO fue reportada en cerebro (Gal y co., 1966), fue hasta 1977 que apareció el primer reporte definitivo sobre la presencia de algunos productos de esta vía en el SNC (Joseph y col. 1978).

Aproximadamente el 40 % de la L-kinurenina detectada en el cerebro es sintetizada en este tejido. Se ha demostrado la presencia de la L-kinurenina en tejido de cerebro humano post mortem, y aunque no hay diferencias bien reportadas entre sujetos sanos y enfermos de esquizofrenia, la interpretación es complicada por un rápido incremento en el cerebro de las concentraciones de L-kinurenina después de la muerte (Stone, 1993).

El primer reporte de la presencia del QUIN en el cerebro (Lombardi y col., 1983; Wolfensberger y col 1984) fue después del desarrollo de una técnica de espectrofotometría de masas que es sustancialmente sensible a los incrementos de QUIN con respecto a otros métodos, dando rendimientos de QUIN por debajo de 12 pmol/mg o 2.1 nmol/g de tejido de cerebro de rata (Lombardi y col., 1983).

Estos valores corresponderían a una concentración aproximada de $2\mu\text{M}$ en todo el cerebro, aunque fue reportado un grado de heterogeneidad lo largo de diferentes regiones del cerebro, existiendo niveles superiores en neocorteza (2.1 nmol/g) e inferiores en el estriado (0.6 nmol/g). Se demostró que el QUIN también está presente en cerebros normales humanos post mortem, presentando niveles notablemente similares a los de la rata y otras especies (Wolfensberger y col 1984).

La administración del triptofano puede aumentar los niveles de QUIN y 5HT en cerebro de rata. Esto se observó de igual manera a partir de otros resultados en los cuales se midieron las concentraciones extracelulares de QUIN en el cuerpo estriado por el método de microdiálisis (During y col., 1989).

En pacientes con deficiencia nutricional de triptofano se observaron síntomas de alteraciones en el SNC, tales como alucinaciones, signos de confusión y demencia; estos signos pueden estar relacionados al incremento de la activación de los receptores para NMDA por elevación en los niveles del QUIN (stone, 1993).

En un estudio con ratas de 3 días a 30 meses de edad, se observó un incremento en los niveles del QUIN dependiente de la edad (Moroni y col., 1984). Como una extensión de estos estudios, se analizaron los contenidos de QUIN en muestras de cerebros de pacientes con demencia senil tipo Alzheimer (Moroni y col., 1986).

Farmacología de las kinureninas

La farmacología de las kinureninas, incluyendo el QUIN, esta íntimamente relacionada con los AAE. Entre los transmisores endógenos considerados AAE están L-glutamato, L-aspartato, homocisteina, y ácido cisteinsulfónico; son los principales candidatos y que aparecen actualmente como candidatos en varios subtipos de receptores neuronales (Watkins y Evans, 1981; Stone y Burton, 1988; Collingridge y Lester, 1989). Dentro de éstos también se incluyen agonistas cuyos

materiales primarios son de origen exógeno, como son; NMDA, ácido kainico, AMPA, ácido-2-amino-4-fosfobutanóico, y ACDP.

Por otro lado, los receptores NMDA están involucrados en la determinación de la viabilidad de la célula, la sobreactivación de estos receptores resulta en una serie de eventos citotóxicos; estos pueden ser importantes para la explicación de la muerte de algunos grupos neuronales, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer, desórdenes neurodegenerativos como la EH, y la esclerosis amiotrofica lateral, y algunos de los amplios daños resultados del infarto cerebral. En casos recientes, la hipoxia o isquemia se atribuye a un resultado en un flujo excesivo de glutamato, aspartato y posiblemente otros AAE endógenos, resultando en la activación de receptores para NMDA y causando excitotoxicidad.

El primer reporte de la actividad excitatoria del QUIN fue el resultado de experimentos en la corteza cerebral de ratas anestesiadas; en cada una fue demostrado no solo que el QUIN puede excitar neuronas, con una aparente potencia similar al NMDA, pero algunas de estas excitaciones pueden ser prevenidas por antagonistas selectivos de receptores a NMDA, como el ácido-2-amino-5-fosfopentanoico (2AP5) (Perkins, 1981). Mediante estudios de microiontoforesis se observó que el QUIN es aproximadamente un 25% tan activo como el glutamato y el aspartato (Stone y Perkins, 1981).

La propuesta inicial de que el QUIN es un ligando para los receptores fue puesta en duda cuando se descubrió mediante estudios extracelulares que neuronas de diferentes partes del sistema nervioso presentaron una sensibilidad diferente a NMDA y QUIN. La explicación propuesta para estos resultados es que pueden existir dos poblaciones de receptores en el SNC: el sitio NMDA-1, localizado en la espina dorsal y cerebelo y activado por NMDA; y el sitio NMDA-2 que se encuentra en neocorteza, hipocampo y estriado y es activado por QUIN (Perkins y Stone, 1983).

La selectividad del QUIN por receptores NMDA es apoyada por estudios de unión, en los que se observó que al parecer el cerebelo tiene una forma de receptor para NMDA farmacológicamente distinta de la corteza e hipocampo, habiendo sensibilidad al QUIN. La unión de dizolcipina a la membrana del hipocampo es más fácilmente desplazada por antagonistas competitivos NMDA que en cerebelo. Adicionalmente se ha observado que el QUIN es significativamente más activo para desplazar la unión de glutamato de cerebro externo que de cerebelo (Yoneda y Ogita, 1991).

El QUIN y el NMDA son capaces de incrementar los niveles de calcio intracelular (Tsuzuki y col. 1989; Lu y col. 1991), esto probablemente por una despolarización periódica con aparente aumento en la resistencia de la membrana resultando en una activación de canales de calcio dependientes de voltaje. El uso de bloqueadores de canales de calcio, nifedipina, o cobalto (Peet, 1986) previenen el daño en cultivos neuronales sometidos a QUIN y otras excitotoxinas.

Neurotoxicidad de las kinureninas

Se han realizado varias revisiones sobre los A.A. y su neurotoxicidad (Schwarcz y col., 1984; El-Defrawy y col., 1986). Es alrededor de 1980 cuando se comienza a elucidar la relación entre el ácido kainico y NMDA como posibles agentes que pueden producir una combinación de neuroexcitación con neurodegeneración, una combinación que refleja como excitotoxicidad. La iniciación de la neurodegeneración, en muchos casos, es la acumulación de calcio intracelular, con la activación de proteasas y fosfolipasas y la iniciación de fenómenos que implican la generación de radicales libres y la peroxidación de lípidos; los eventos antes citados pueden ser responsables de muerte celular (Farber, 1981; Garthwaite y Garthwaite, 1986; Siesjo y Wieloch, 1985; Verity, 1992; Stone, 1993 en Stone, 1993).

Con la administración directa del QUIN en el cuerpo estriado, se produce una lesión que no afecta al axón, con una marcada hinchazón de dendritas,

vacuolización y pérdida de estructuras celulares en sitios post sinápticos, pero generalmente con una buena conservación de axones y terminales presinápticas (Schwarcz y col. 1983; McGeer y Singh, 1984). Cabe señalar que las áreas del cerebro más sensibles a esta neurotoxicidad son el hipocampo, y estriado.

El papel del QUIN y del KYNA aún no es claro, pero en algunas patologías se ha observado una acumulación de QUIN en el cerebro, por lo que se le ha involucrado en convulsiones (Lapin, 1981), EH (Beal y cols., 1986; Kim y Choi, 1987; Schwarcz y cols., 1988; Beal y cols., 1990), encefalopatía hepática (Moroni y cols., 1986) y al desorden neurológico que se presenta en la enfermedad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH) (Heyes y col, 1989).

El QUIN como una herramienta experimental

La demostración de que el QUIN puede producir degeneración en el estriado fue acompañada por la especulación que este agente pudiera estar relacionado como un factor etiológico hipotético en investigaciones concernientes a la EH: La acumulación crónica de QUIN en el SNC puede resultar en un incremento de la muerte neuronal, principalmente de la significativa disminución neuronal observada en la EH de estriado y neocorteza(Schwarcz y col. 1984; Stone y col.1987). Esta hipótesis fue basada en la comparación cruda de la motilidad y cambios de conducta en animales lesionados con QUIN y pacientes con EH (Mason y Fibiger, 1979; Samberg y col 1989). Además en la EH se ha encontrado que la actividad de la 3-hidroxiantranilato oxidasa, enzima limitante del 3-HK, esta aumentada en pacientes con EH (Schwarcz y cols., 1998) por lo que se sugiere una participación del QUIN en esta enfermedad, por otro lado experimentos realizados en el modelo de la EH inducido por QUIN sugieren la participación de esta toxina como un activador del gen de la huntingtina (Tatter y cols., 1995; Carlock y cols., 1995).

La hipótesis llevo a ser más seria, sosteniéndose como una explicación de EH cuando Beal y col. (1985) observaron que la inyección intraestriatal de QUIN,

producen características típicas de EH en estriado reproduciendo exactamente el perfil visto en la enfermedad (Beal y col. 1986). Aunque diversos estudios cerebrales muestran una localización del QUIN en las neuronas, otros han puntualizado una localización extra neuronal de este ácido dicarboxílico. Estudios inmunocitoquímicos que involucran la histoquímica de las enzimas formadoras del QUIN, demostraron que la 3-HAO y la QPRT están localizadas en las células gliales, así como también un estudio basado en la estimulación inmune reveló un aumento en los niveles de QUIN en el cerebro.

Los procesos tóxicos por los cuales el QUIN ejerce sus efectos en el SNC, alterando bioquímica y morfológicamente el funcionamiento celular, son diversos e incluyen:

- 1) Activación de receptores presinápticos
- 2) Factores transcripcionales
- 3) Rompimiento citoesquelético
- 4) Peroxidación de Lípidos
- 5) Contribución de otras Kinureninas

El primer modelo de toxicidad para explicar los efectos nocivos del QUIN en el cerebro representa de manera muy elemental la participación de este agonista de los receptores de tipo NMDA a nivel de las sinapsis glutamatérgicas (Schwarcz y col., 1984). A partir de dicho modelo, el concepto de neurotoxicidad referente a la alteración de los procesos convencionales de transmisión sináptica por la sobre-activación de los receptores involucrados tomó gran importancia. Según este modelo, el QUIN puede actuar de dos formas: la primera es activando los receptores presinápticos específicos para NMDA o para el mismo QUIN, induciendo así la liberación por excitación, de un posible neurotransmisor endógeno, el cual a su vez, puede unirse a un receptor postsináptico glutamatérgico de tipo NMDA; o bien, activando receptores glutamatérgicos de tipo NMDA directamente sobre la estructura postsináptica con la consecuente cascada de eventos iónicos y metabólicos que dicha activación implica.

Parece claro que los neurotransmisores liberados desde la estructura presináptica por la activación de receptores presinápticos tipo NMDA, podrían ser el glutamato, el aspartato u otro agente excitador desconocido (Fig. 8) (Schwarcz y col., 1984). Es sabido que el resultado final de la presencia prolongada de agentes excitadores en el espacio sináptico es la excesiva activación de las neuronas, las cuales son excitadas hasta la muerte. Los mecanismos iónicos de dichos procesos apuntan a los canales permeables a sodio y calcio asociados a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA y juegan un papel determinante en la serie de eventos que llevarán a la muerte celular (Bruyn y Stoof, 1990).

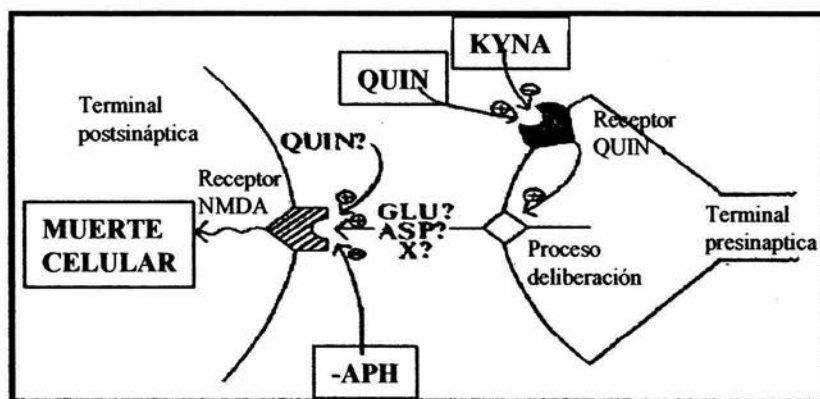


Fig 8 MODELO DE NEUROTOXICIDAD DEL QUIN PROPUESTO POR SCHWARCZ Y COLS., El ácido quinolínico podría estar actuando sobre los receptores postsinápticos para NMDA o bien, sobre receptores presinápticos específicos. (Models for neurodegenerative disorders, *Life Science*, vol. 35, No. 1 19-32, 1984)

Está reportado que la PL in vitro está aumentada después de la administración intraestriatal de concentraciones micromolares de QUIN, lo que apoya la hipótesis que establece la relación entre eventos excitotóxicos y los procesos oxidativos causados por el QUIN (Santamaría y Ríos 1993). Dichos autores postularon que al administrar QUIN en el cuerpo estriado de la rata se produce un daño neuronal a través de los siguientes procesos:

1. El QUIN provoca una sobreactivación de los receptores a NMDA, que a su vez produce una apertura selectiva de canales de Ca^{2+} .

2. Hay un aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en las neuronas que tienen receptores a NMDA.
3. Se produce una sobreproducción de radicales libres a través de procesos dependientes de Ca^{2+} .
4. Ocurre una destrucción celular mediante la acción de radicales libres, vía Peroxidación de Lípidos (PL) entre otros procesos.

RADICALES LIBRES Y SU IMPLICACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Radicales Libres

Los radicales libres son generalmente moléculas muy reactivas, que contienen un electrón desapareado. Ellos son producidos continuamente en las células como producto del metabolismo, o por ejemplo, en la fosforilación oxidativa y en la respiratorio mitocondrial (Zwar, 1999).

La molécula del oxígeno es un birradical pues tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital diferente y con su giro (spin) en la misma dirección ($\uparrow \uparrow$). Este arreglo molecular determina una menor habilidad del oxígeno para aceptar un par de electrones de otra molécula cuyos electrones periféricos se encuentran rotando con un spin antiparalelo ($\uparrow \downarrow$) y ésto restringe las posibilidades de reducción del O_2 , las cuales tienden a llevarse a cabo mediante la aceptación de electrones de uno en uno, lo que retarda las reacciones con especies no radicales (Zentella, 1994).

La toxicidad del oxígeno posiblemente es el resultado de la producción exagerada de especies muy reactivas como son los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), los singuletes del oxígeno, los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Torrens y col 1982) así como el superóxido (O_2) (ver tabla 4) (Fridovich, 1983). El radical hidroxilo es formado en la reacción de Fenton.

Por otro lado, es muy importante mencionar que en el proceso de la fosforilación oxidativa realizado durante el metabolismo celular que conduce a la formación de agua, se forman radicales libres mismos que son transformados gracias a la acción del sistema enzimático mitocondrial de la citocromo oxidasa, en colaboración con las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Zentella, 1994).

TABLA 4

DISTRIBUCIÓN ELECTRONICA EN EL ORBITAL PERIFERICO DE LAS DIFERENTES FORMAS DEL OXIGENO		
Estado	Electrones periféricos	Reactividad
Oxígeno molecular	↑ ↑	Baja
Singulete de oxígeno delta	↓ ↑	Alta
Radical Súper oxido	↓ ↑ ↓	Baja
Singulete de oxígeno sigma	↑ ↓	Muy baja
Ion peróxido	↓ ↑ ↓ ↑	Baja

Establecer la implicación de los radicales libres en la patogénesis de una enfermedad es extremadamente difícil debido al corto tiempo de estas especies (Uchida, 2000). Además en muchas enfermedades no es aún claro si los radicales libres son la causa del daño o están formados como resultado de la enfermedad (Uchida, 2000). Los radicales libres reactivos, formados dentro de la célula pueden oxidar biomoléculas y ésto puede conducir a daño de tejido y muerte celular (Zwar1999).

Reacción de Fenton

La fisión homolítica del enlace O-O* H₂O₂ produce 2 radicales hidroxilo (OH*). La homólisis puede realizarse por calor o por radiación ionizante. Una

mezcla de H_2O_2 y una sal de Hierro (II) puede formar también un radical OH^* , como fue observado por Fenton en la reacción que lleva su nombre (1849):



De esta manera el hierro localizado en el SNC pasa de un estado de oxidación a uno de reducción formando un radical libre y una molécula hidroxilo (Zentella y cols., 1994). Como ya se mencionó, el hierro puede ser un agente potencial de producción de radicales libres. De esta forma, una simple mezcla de una sal de hierro y H_2O_2 puede provocar una cascada de reacciones de radicales.

Por su parte las sales de cobre (I) pueden reaccionar con H_2O_2 para formar radicales OH con una incidencia mayor que las sales de hierro



En el caso del hierro y el cobre, se encuentran normalmente en la dieta; sin embargo, el hierro es almacenado en proteínas como la ferritina y la hemoglobina para su transporte en la sangre y la ferritina parece estar implicada en el fenómeno de reducción del hierro.

En pacientes que murieron por Alzheimer se detectaron grandes depósitos de Fe^{3+} , lo cual hace pensar en un daño oxidativo con la generación de radicales libres que pueden actuar en células nigrales para un proceso de excitotoxicidad.

Peroxidación por radicales libres

Las reacciones de degradación peroxidativa conducen a la formación de intermediarios aldehídicos reactivos inestables que forman fácilmente aducciones covalentes intra e intermolecular con varias moléculas tales como proteínas y fosfolípidos (ver Fig 9) (Uchida, 2000).

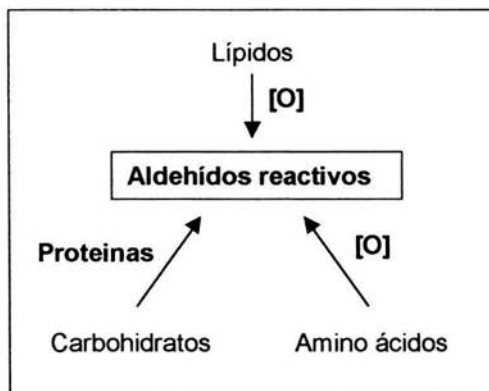


Fig 9 Vías potenciales de formación de aldehídos reactivos, involucradas con el estrés oxidativo

La peroxidación de lípidos (ver Fig. 10) procede de un mecanismo de reacción en cadena de radicales libres y produce hidroperoxidos de lípidos como productos de reacción principal. Subsecuentemente, la descomposición de hidroperoxidos de lípidos genera un número de productos imprevistos que muestra una amplia variedad de acciones dañinas.

Comparando los radicales libres con los aldehídos, derivados de la PL, estos últimos son estables y pueden difundirse dentro o aun escapar desde la célula y atacar blancos lejos del sitio del evento original. Además, ellos no están sólo como productos finales, remanentes de peroxidación de lípidos, si no también en procesos de glicación de la peroxidación lipídica o pueden actuar como "mensajeros citotóxicos secundarios" para las reacciones primarias.

El SNC es especialmente susceptible a la PL debido a:

- 1) El alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados dentro de las membranas de las células nerviosas
- 2) La baja actividad de la catalasa y las concentraciones moderadas de súper-óxido dismutasa y glutatión peroxidasa en el cerebro
- 3) El alto contenido de hierro en algunas regiones cerebrales, preferencialmente en ganglios basales (Santamaría, 1995).

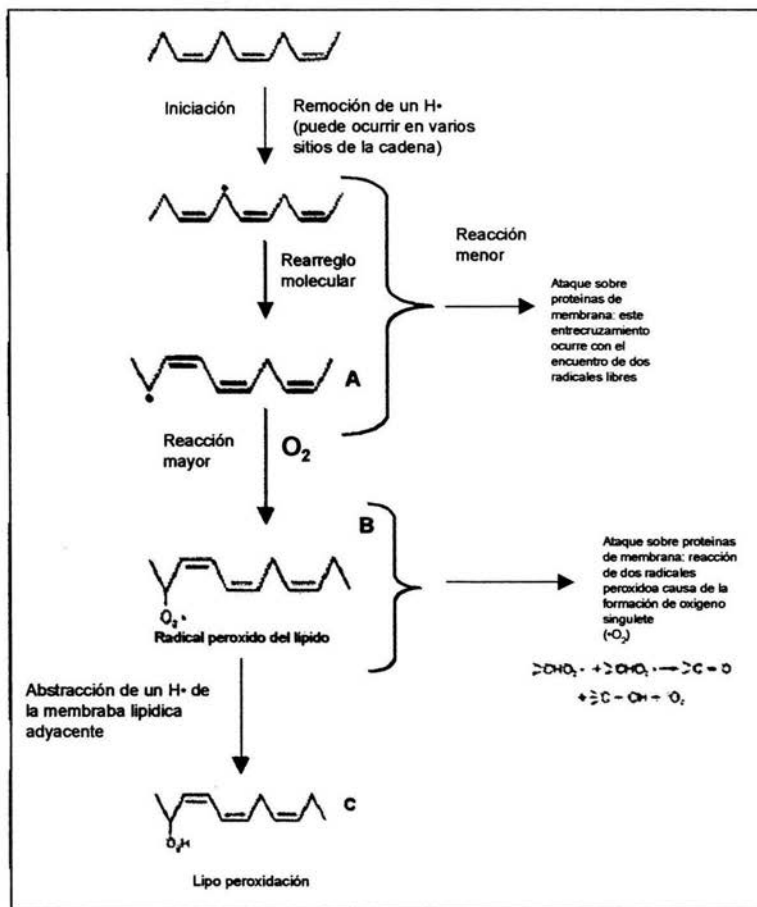


Fig 10 MECANISMOS DE PEROXIDACIÓN DE LIPIDOS (Gutteridge, JMC y Halliwell Barry, TIBS, 129-135 1990)

Fuentes de aldehídos reactivos

Los ácidos grasos polinsaturados en ésteres de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos están sujetos a la oxidación de radicales libres y pueden participar en reacciones en cadena para amplificar el daño a biomoléculas (Uchida, 2000).

Un rasgo clave de la peroxidación lipídica es la descomposición de los ácidos grasos polinsaturados para producir un amplio arreglo de pequeños

fragmentos, de tres a nueve carbonos de longitud, incluyendo aldehídos tales como 2-alquenes y 4-hidroxi-2-alquenes (Uchida, 2000).

Entre los 2-alquenes, acroleína, contaminante ubicuo en el ambiente, es con mucho el más fuerte electrófilo (Uchida 2000). La acroleína reacciona con una variedad de sitios nucleofílicos en la proteína y el DNA, conduciendo a aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas, mutaciones puntuales y reducción de la eficiencia formadora de colonias en cultivos bacterianos (Uchida, 2000).

Los 4-hidroxi-2-alquenes representan la más prominente sustancia generada durante la peroxidación lipídica. Entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) es conocido como el principal aldehído formado durante la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados omega 6 ($\omega 6$), tal como el ácido linoléico y el ácido araquidónico (Uchida, 2000).

La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 ($\omega 3$) genera un compuesto relacionado cercanamente, 4-hidroxi-2-hexenal, el cual es un mediador potencial de transmisión de permeabilidad mitocondrial (Uchida, 2000).

Otro importante aldehído reactivo originado de peroxidación lipídica son los cetoaldehídos, incluyendo malonaldehído (MDA) y glicoxal (Uchida, 2000).

Receptores NMDA y Radicales Libres

La entrada del calcio al citoplasma, producida por la sobreactivación de receptores de tipo NMDA, así como la activación de la proteína-quinasa C, tienen efectos sinérgicos en la liberación de superóxido de las células endoteliales (Ríos y Santamaría 1991; Lancelot y cols., 1995). Durante la isquemia, hay incremento considerable de calcio intracelular que activa fosfolipasas y liberación de ácidos grasos libres como el ácido araquidónico, el cual es metabolizado mediante la

lipoxigenasa y la ciclo-oxigenasa, con la consecuente producción de radicales libres y prostanoïdes vasoconstrictores (Tomado de Santamaría, 1995).

Adicionalmente, el calcio puede activar la proteasa calpaina, la cual modifica una cadena peptídica de la xantina deshidrogenasa y la convierte en xantina oxidasa en los vasos sanguíneos cerebrales del endotelio. Un incremento en la actividad de la xantina oxidasa puede contribuir a la generación de radicales libres, como resultado del incremento en el metabolismo de la vía de la xantina al ácido úrico (Tomado de Santamaría, 1995).

Además de la sobre-activación de receptores NMDA, muchas de estas alteraciones ocurren por lipólisis y daño mitocondrial. Así pues, la relación entre los estados excitotoxicidad y producción de radicales libres puede ser bidireccional. Mediante estudios realizados por microdiálisis se encontró que una estimulación de receptores a NMDA aumenta la producción basal de OH^{\bullet} en el cuerpo estriado de la rata, demostrando que esta producción es mediada por estos receptores (Lancelot y cols., 1995).

Después de los datos revisados podemos concluir que una sobreactivación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA una serie de eventos citotóxicos que son generadores potenciales de radicales libres, con la consecuente peroxidación de lípidos provocada por estos radicales.

Metales de transición en eventos oxidativos

Los elementos traza representan un tercer grupo de elementos utilizados por los organismos vivos de los que se sabe son esenciales para el hombre algunos de estos metales son el cobre, cobalto, manganeso, molibdeno, zinc, selenio y yodo.

A pesar de que las concentraciones de estos elementos en el organismo son relativamente bajas, su importancia ha sido comparada con la de las vitaminas, ya que desempeñan funciones tales como; enzimas con múltiples

funciones en diferentes vías metabólicas y cofactores para reacciones metabólicas, entre otros. Las propiedades de estos metales unidos a diferentes ligandos, por ejemplo metaloenzimas, les permite actuar como aceptores de electrones en reacciones biológicas de tipo redox.

EL COBRE

Es un micro nutriente esencial que se encuentra en todos los tejidos de mamíferos donde se encuentra principalmente unido a proteínas o a otras moléculas orgánicas. Se presenta en diversas formas mono, divalente, catiónica soluble en agua y sales simples y en el organismo humano solo hay unos 80 mg de cobre (Hicks, 2000). La dieta del humano en los estados del oeste de los Estados Unidos tiene aproximadamente 0.6-1.6 mg Cu/d, aunque el aporte diario recomendado es de 1.5-3.0 mg par adulto y las fuentes principales dietéticas animales y vegetales son el hígado, riñon, aves, pescados, mariscos, nueces, semillas, desecados de legumbres y cereales integrales (Linder, 1991a).

Absorción

La eficiencia de la absorción del metal es alta. En mamíferos, la absorción del cobre probablemente ocurre en intestino delgado (después de la digestión de la comida), en estómago y duodeno (Linder y Hazegh-Azam, 1996). El balance del cobre está controlado por el aporte alimenticio y por las variaciones de eliminación de las heces (Linder y Hazegh-Azam, 1996). La transferencia a través de la mucosa intestinal ocurre probablemente por difusión no dependiente de energía (Linder, 1991b). Los sitios de absorción parecen estar asociados probablemente entre el cobre y los metales de transición Zn (II), compitiendo ambos por los sitios de unión a los ligandos; el Fe (II/III) inhibe la transferencia del cobre de la dieta a la sangre (Linder, 1991a). Actualmente la absorción para ratas está debajo de 30-50% / 24 hrs (Linder, 1996).

Transporte y distribución.

En la primera fase, en la entrada al fluido intersticial y al plasma sanguíneo, desde las células intestinales, el cobre comienza inicialmente el transporte en dos proteínas: la albúmina y la transcupreina, en la vena porta y en la circulación en

general. La ceruloplasmina (Cp) no participa en el intercambio del cobre plasmático y no liga o incorpora al metal cuando está en exposición a iones Cu. Es durante la síntesis de esta proteína, por el hígado, donde se incorpora el metal (Tomado de Linder, 1996). La segunda fase del transporte del cobre está mediada por la Cp; el mecanismo aun no esta establecido (Tomado de Linder 1996). En la Fig. 11 se muestra la distribución del cobre en el organismo

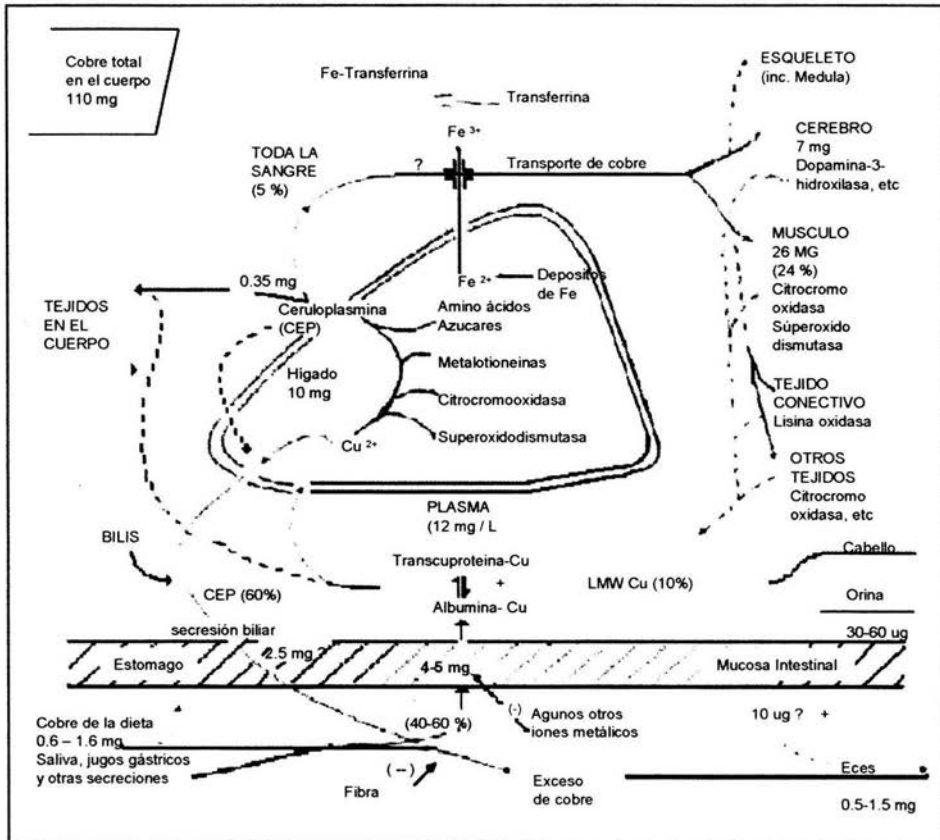


Fig 11 Se muestra la bioquímica del y el metabolismo del Cobre en el Humano Adulto. Los valores de Cobre indican la ingesta diaria durante un mes, la absorción, secreción y su localización en varios fluidos. Copper biochemistry and molecular biology. (Linder y Hazegh-Azam; *Am. J. Clin. Nutr.* vol. 63:797S-811S, 1996)

Función Bioquímica del cobre.

El cobre actúa en la absorción y utilización del hierro, transporte de electrones, metabolismo de las purinas y desarrollo del sistema nervioso.

La deficiencia del cobre se observa con poca frecuencia en el hombre, puede manifestarse en enfermedades como anemia asociada a la deficiente unión de Fe al grupo hemo (Davis, 1987), desmielinización (Linder, 1996) y degeneración del SN (Harmann, 1992), ataxia (Harmann, 1992), defectos en la pigmentación (acromotriquia), estructura del pelo (Hicks, 2000) y lesiones cardiovasculares.

Dos enfermedades genéticas están asociadas al transporte del cobre. Una de estas (Síndrome de Menkes) resulta en deficiencia del cobre en riñón, la otra (Enfermedad de Wilson) en una sobreacumulación del cobre y toxicosis. Los genes para estas enfermedades han sido clonados en modelos animales, en ratón para Menkes y rata para Wilson.

La Enfermedad de Wilson (Identificada por SA Kinnier Wilson en 1912) es caracterizada por una baja concentración de ceruloplasmina en sangre y un marcado incremento de cobre en hígado y cerebro, esta enfermedad es causada por la mutación o delección del gen para la ATPasa tipo-P de 1411 a.a. la cual se sabe esta asociada al transporte de cationes a través de la membrana bacteriana, en el hígado, este defecto genético no permite que el cobre participe en la síntesis de la ceruloplasmina, impidiendo la formación del principal transportador de cobre extracelular, algunos de los síntomas observados por Wilson fueron cirrosis hepática, daño a lo largo del cerebral con depósitos de cobre en la cornea ocular, en el genotipo Asiático de esta enfermedad se han observado además hiperpigmentación del pie, problemas esqueléticos, amenorrea y pequeños episodios epilépticos (Linder, 1991a).

Por otra parte el Síndrome de Menkes es una enfermedad ligada al cromosoma X de carácter recesivo caracterizada por una severa deficiencia de Cu, aunque hay acumulación en algunas células (fibroblastos, riñón y placenta) el defecto primario es en la primera fase de transporte del Cu.

La mayor cantidad del cobre en el organismo se encuentra unido a proteínas (enzimas) las cuales tienen diferentes funciones:

Citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1) es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y es un sitio donde se utiliza el O₂. Cataliza la reducción del O₂ a H₂O mediante la siguiente reacción.



De donde los protones y los electrones provienen del NADH y EL FADH₂ producidos mediante el ciclo de Krebs, pasando por una serie de reacciones de óxido-reducción hasta transferirse al oxígeno molecular. El proceso de esta óxido-reducciones se produce en el espacio intermembranal de la mitocondria con una caída de potencial suficiente para producir 3 moléculas de ATP por cada una de NADH y 2 de ATP por cada una de FADH₂. La deficiencia de cobre no produce una reducción de la actividad de la citocromo c oxidasa o de la respiración mitocondrial (Linder, 1991a).

SOD (EC1.15.1.1.) La SOD o superóxido dismutasa es una enzima cobre-zinc dependiente, se encuentra distribuida en el citoplasma de las células eucarióticas. La SOD cataliza la dismutación de 2 O₂^{*} a O₂ y H₂O, como se muestra en la siguiente reacción.



En transfecciones experimentales tipo Knockout se comprobó que la Cu-Zn-SOD es una enzima crítica en el mecanismo de defensa antioxidante.

Metalotioneinas. Son péptidos pequeños que contienen cisteína y son expresadas por la mayoría de células responsables de la carga de los metales de

transición, especialmente Zn(II), Cd(II), y Cu(II), pero no de Fe(II). Están implicadas en mecanismos de detoxificación (Linder, 1996).

Ceruloplasmina (EC 1.16.3.1.) Está entre las enzimas involucradas en la fase aguda de la reacción de inflamación y en la detoxificación de los radicales, como protección de la célula a daño oxidativo. Su función es de transporte independiente del cobre desde el hígado hasta otras células. Otra función es la de auxiliar en la unión del ión a la transferrina; ésta es la proteína que transporta al Cu en el plasma sanguíneo (Miura y cols., 1993; Frieden, 1981). La ceruloplasmina tiene una actividad ferroxidasa y participa en la oxidación del Fe(II) a Fe(III), un paso importante en la detoxificación de la reacción de Fenton para la producción de radicales libres (Hicks, 2000). Normalmente los pacientes con enfermedad de Wilson presentan niveles bajos en la concentración de esta enzima (Hicks, 2000). La ceruloplasmina sintetizada y excretada por el hígado es un regulador de la inflamación aguda por hormonas (Interleucinas IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (Linder, 1991a). La ceruloplasmina también puede ser sintetizada en el cerebro; se ha encontrado un aumento en las concentraciones de esta enzima en enfermedades como Alzheimer en Hipocampo y corteza frontal (Hicks, 2000).

Lisina oxidasa (Lisina-6-oxidasa EC 1.4.3.13) Esta es otra enzima extracelular dependiente de cobre y es crítica en la formación y función de tejido conectivo en todo el cuerpo. Su función es catalizar el enlace-cruzado de una nueva hebra de colágeno y fibras de tropoelastina a través de la desaminación oxidativa de la lisina. Los síntomas de una severa deficiencia de cobre incluyen la carencia de colágeno, mutarrotación y deficiencias en el envolvimiento de la sangre del vaso por las fibras de elastina, pudiendo resultar esto en un aneurisma (Linder, 1996; Hicks, 2000).

Tirosinasa (monofenol monoxigenasa: (EC 1.14.18.1.) Es la enzima responsable de la síntesis de los pigmentos de melanina para la protección del

cabello y los ojos de color al daño por la exposición a un exceso de rayos ultravioleta. La enzima está asociada con neuronas noradrenérgicas (Linder, 1996)

El cobre y los Receptores NMDA

Es perfectamente conocida la interacción de metales con canales iónicos por ejemplo la relación entre iones zinc, mercurio y cobre y los receptores para GABA_A (Ma y Narahashi, 1993), por lo que Weiser y Wienrich (1996) demostraron que el Cu²⁺ inhibe receptores a glutamato como p.e. receptores AMPA / Kainato en cultivos neuronales de rata. Estos investigadores observaron, al comparar la acción del Cu²⁺ contra un antagonista de receptores para AMPA 2,3-dihidro-6-nitro-7-sulfamoiil-benzoquinoxalina (NBQX) que el ion Cu²⁺ presenta una inhibición de tipo exponencial doble, en comparación con NBQX que presenta una inhibición exponencial simple, por lo que ellos concluyeron que el cobre posiblemente interaccionaba con dos sitios dentro de estos receptores, además de observar que esta inhibición de Cu²⁺ se pierde cuando se agregan altas concentraciones de kainato o un antioxidante ditioneitol (DTT), sin embargo estos mismos estudios sobre receptores para NMDA demostraron la inhibición de estos por Cu²⁺ no es dependiente de la oxidación del metal.

Sobre esta misma línea de investigación Vlachová y cols. (1996) estudiaron en cultivos neuronales de hipocampo de ratón la inhibición en la actividad de los receptores para NMDA mediada por Cu²⁺, concluyendo que el Cu²⁺ inhibe directamente la actividad de receptores para NMDA, comportándose como un antagonista no competitivo y no interfiere directamente con el sitio de glutamato o glicina de estos receptores, sugiriendo que el Cu actúa sobre un sitio vinculado con el complejo *receptor para NMDA-canal* el cual esta localizado extracelularmente y fuera del lado del campo eléctrico de la membrana. Se sugiere entonces que el Cu puede atenuar los daños producidos por una sobreactivación de receptores para NMDA.

CAPITULO II Proceso Metodológico

2.1 Justificación y planteamiento del problema

Se ha utilizado la administración intraestriatal de QUIN, como un modelo generador de la Enfermedad de Huntington en ratas, para activar receptores de tipo NMDA provocando entre otros efectos; un aumento de los niveles de calcio intracelular, activando un proceso de estrés oxidativo con la consecuente peroxidación de lípidos, disminución de los niveles de GABA así como la disminución en la actividad las enzimas con función antioxidante (por ejemplo ceruloplasmina). Por su parte, el cobre está presente en un gran número de enzimas con función antioxidante, además de presentar un efecto modulador en receptores tipo NMDA.

Por lo anterior se propone evaluar el efecto del cobre en un tratamiento agudo, sobre los parámetros bioquímicos antes señalados, esperando una atenuación de los daños producidos por el QUIN.

2.2. Objetivo general

- Valorar si la administración sistémica aguda de cobre, previa a una lesión intraestriatal de QUIN, puede atenuar algunos de los marcadores de daños producidos por el QUIN en el modelo experimental de la EH en ratas.

2.3. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la administración sistémica del cobre en la peroxidación de lípidos, bajo tres diferentes dosis, previa a una inyección intraestriatal de QUIN.
- Caracterizar la dosis de cobre que presente una mejor protección sobre los efectos en la PL por QUIN, y los efectos en los niveles de GABA.
- Evaluar bajo las mismas condiciones experimentales, el efecto del cobre en la actividad de la Cp en LCR y su contribución al modelo experimental de la EH por QUIN.

2.4. Hipótesis

- La administración sistémica de cobre atenuara el daño producido por una inyección intraestriatal de QUIN en ratas valorando el daño en diferentes parámetros bioquímicos.

2.5. Variables

- PL producida por la administración intraestriatal de QUIN expresada como Unidades de Fluorescencia por miligramo de proteína
- Niveles de GABA determinados por la técnica de HPLC, expresados como μg de GABA por miligramo de tejido.
- Actividad de la ceruloplasmina de LCR, expresado como porcentaje de actividad vs control.

2.6 REACTIVOS Y MATERIAL

Todos los reactivos, animales, aparatos y técnicas empleadas fueron provistos por el departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

2.6.1 Reactivos

SIGMA CHEMICAL Co. (St. LOUIS, MISSOURI, USA)

Ácido Quinolínico (QUIN)

Albúmina de bovino

Apomorfina (APO)

Tiocianato de potasio

Sulfato ferroso

Reactivo de Folin y ciocalteu's fenol

2-mercapto-etanol

Ácido nítrico

E. MERCK DE MÉXICO

Ácido Sulfúrico (H₂SO₄)

Hidróxido de Sodio (NaOH)

Sulfato de Cobre (CuSO₄)

Tartrato de Sodio y Potasio (C₄H₄KNaO₆)

TRIS (C₄H₁₁NO₃)

J.T. BAKER (MÉXICO)

Cloroformo (CHCl₃)

Éter etílico

Sulfato ferroso amoniacal (FeNH₄(SO₄)₂*12H₂O)

SMITH KLINE BEECHAM (MÉXICO)

Pentobarbital Sódico

ABBOT Laboratorios de México S.A. de C.V.
Solución de cloruro de sodio al 0.9 % (S.S.I.)

2.6.2. SOLUCIONES

Para el QUIN:

Preparación del QUIN 240 nmol/ μ L (pH 7.4)

Se pesan 0.4010 g de QUIN y se disolvieron en 10 mL de S.S.I. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH 1N.

Preparación del estándar de quinina en H₂SO₄ 0.05 M:

Se pesaron 10 mg de sulfato de quinina y se disolvieron en 100 mL de una solución de H₂SO₄ 0.05 M. De esta solución se tomaron 100 mL y se aforan a 100 mL con la misma solución de H₂SO₄ 0.05 M. La solución resultante fue de 100 ng de sulfato de quinina / mL.

Para las soluciones de cobre:

Se prepararon 4 soluciones de CuSO₄ para obtener las concentraciones de 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/kg que fueron empleadas para los tratamientos i.p. 30 minutos antes de la inyección intraestriatal con QUIN

Para la fase móvil en la determinación de GABA por HPLC:

Solución A: Buffer de acetatos 50 mM (pH 5.9) conteniendo 1.5 % de tetrahidrofurano.

Solución B: Metanol grado HPLC como solvente

Para la determinación de proteínas:

CuSO₄ al 1%, se pesa 0.5 g CuSO₄ y se disuelve en aproximadamente 20 mL de agua desionizada, después se aforan a 50 mL.

Solución de carbonato de sodio en NaOH al 0.1 N

Para la determinación de PL:

Mezcla cloroformo-metanol 2:1 (v/v)

Para la determinación de la actividad de la Cp:

Solución de cloruro de sodio NaCl	0.15 M
Buffer de Acetatos	0.3 M pH 6.0
Solución de sulfato Ferroso amoniacal	0.01 M
Solución de sulfato Ferrico amoniacal	0.01 M

2.6.3. Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g de peso. Los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua, así como condiciones controladas de temperatura y presión.

2.7. Diseño de investigación

2.7.1. Evaluación de la P.L. en el cuerpo estriado

Se tomaron 5 grupos de animales, cada uno con n=6; el primero fue el grupo control, con un tratamiento de S.S.I. i.p. 1ml / Kg 30 minutos antes de la lesión intraestriatal con 1 μ L S.S.I. En grupo control, nos mostrará el efecto del cobre i.p. sobre la P.L. basal producida en el cuerpo estriado, así como el efecto de la lesión intraestriatal. Los otros cuatro grupos fueron tratados con las diferentes dosis de (CuSO₄ 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg / Kg i.p.) y la inyección intraestriatal se realizó con 1 μ L de S.S.I.

Con la finalidad de comprobar si la PL está aumentada después de la administración intraestriatal con QUIN, 12 ratas fueron pretratadas con S.S.I. (i.p) y se dividieron en dos grupos: el primero fue el control microinyectado con 1 μ L S.S.I. y el segundo con QUIN (240 nmol/ μ L). Además se incluyeron otros tres grupos, (de n = 6 cada uno) que fueron tratados con Cu a las dosis de 2.5, 5.0, 7.5 mg / kg de peso respectivamente; después se realizó la lesión intraestriatal con QUIN (240 nmol/ μ L). Posteriormente, se procedió a realizar la extracción y disección de el cuerpo estriado derecho 2 horas después de la lesión estriatal, y este tejido se homogenizó en 3 mL de S.S.I. para efectuar la medición de la PL; al mismo tiempo se preparó una alícuota de homogenado para medir la concentración de proteínas. Los resultados se reportaron en U.F/mg de proteína.

Grupo	Pretratamiento con S.S.I.	Pretratamiento con Cu ₂ SO ₄	Microinyección con S.S.I.	Microinyección con QUIN
Control 1	1 ml/kg	—	1 μ L	—
Control 2	—	—	—	240 nmol/ μ L
1	—	2.5 mg/Kg	—	240 nmol/ μ L
2	—	5.0 mg/Kg	—	240 nmol/ μ L
3	—	7.5 mg/Kg	—	240 nmol/ μ L

Tabla 4 Grupos para la evaluación de la PL en el cuerpo estriado de Rata

El papel del cobre en el SNC puede ser influenciado por el ácido ascórbico, por lo que después de elegir una de las dosis de los tres tratamientos anteriores, se determinó el efecto del ácido ascórbico sobre los niveles de PL en diferentes grupos. Se tomaran 8 grupos, con n=6 para cada grupo: el primero fue el grupo control, los tratamientos se describen en la tabla 5 siguiente:

Grupo	Pretratamiento i.p.	Microinyección i.e.
1	SSI	SSI
2	Asc	SSI
3	Cu	SSI
4	Asc + Cu	SSI
5	SSI	QUIN
6	Asc	QUIN
7	Cu	QUIN
8	Asc + Cu	QUIN

Cu = CuSO ₄ 5.0mg/kg
Asc = Ácido ascórbico 500mg/kg
SSI = Solución Salina Isotónica
QUIN = QUIN 240nmol/uL

Tabla 5 Grupos y tratamientos para evaluar el efecto del ácido ascórbico en la PL de cuerpo estriado.

2.7.2. Cobre y niveles de GABA en el cuerpo estriado.

Se tomarán 4 grupos para observar el efecto de la administración de Cu en los niveles de GABA después de la administración i.e. de QUIN.

El primer grupo fue el control con un tratamiento de S.S.I. tanto en la administración i.p. como en la i.e.; el segundo fue el control positivo, S.S.I. i.p. y QUIN i.e.; el tercero se utilizó para mostrar el efecto del Cu en los niveles de GABA, CuSO₄ i.p. y SSI i.e.; y en el último grupo se evaluó el efecto del cobre (CuSO₄ 5.0mg/kg i.p.) después de la administración i.e. con QUIN.

2.7.3. Cobre y actividad de la Cp. después de la administración del QUIN.

Con 4 grupos, de n=6 cada uno, se realizarón los mismos tratamientos que en el experimento anterior para evaluar la actividad de la Cp en líquido cefalorraquídeo (L.C.R.).

2.8. Métodos

2.8.1. Administración estereotáxica del QUIN

El QUIN (240 nmol/ μ L) se administró de manera local en el cuerpo estriado derecho de las ratas, bajo condiciones de anestesia con pentobarbital sódico (40 mg / Kg, i.p.), usando las siguientes coordenadas estereotáxicas: 0.5 mm anterior a bregma, 2.6 mm lateral a bregma y 4.5 mm ventral a dura, de acuerdo con el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1984), usando un aparato estereotáxico para animales pequeños. Los animales control fueron manipulados similarmente con la variante de que la inyección intraestriatal fue realizada con S.S.I.

2.8.2. Medición de la PL

Se siguió la técnica descrita por Triggs y Willmore (1984), la cual se basa en la determinación de productos lipídicos de peroxidación que generan fluorescencia. Alícuotas de 1 mL del homogenado, (tejido más 3 ml de S.S.I.), se adicionaron con 3 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v). Después de agitarse durante 15 segundos en un vortex, la mezcla se refrigeró por 30 minutos protegida de la luz, para permitir la separación de fases. Luego la fase acuosa (fase superior) se aspiró con una bomba de vacío y se desechó. Se tomó un volumen de 800 μ L de la fase orgánica (clorofórmica), se depositó en una celda de cuarzo para fluorescencia, se le agregaron 100 μ L de metanol y se agitó suavemente durante 5 segundos.

La fluorescencia se determinó usando un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS50B, a longitudes de onda (λ) de 370 nm de excitación y 430 de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó a 140 Unidades de Fluorescencia (U.F.) con la solución estándar de quinina. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia por mg de proteína que se determina por el método de Lowry.

2.8.3. Determinación de proteínas por el método de Lowry

Se realizó una curva de calibración con albúmina a 0,25, 50, y 100 mg / mL. Se diluyeron las muestras de tejido estriatal 1:20 para tomar una alícuota de 0.4 mL del homogenizado y se le agregaron 2 mL de la mezcla que contiene 49 mL de carbonato de sodio disuelto en hidróxido de sodio 0.1 N más 0.5 mL de sulfato de cobre al 1% (Lowry y cols., 1951).

Se esperaron 10 minutos después de realizar una agitación y se les agregó a cada tubo 200 mL del reactivo de folin y Cicalteu's fenol; se dejaron reposar los tubos a temperatura ambiente durante 30 minutos, al término de los cuales se evaluó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro Bekman DU-650 a una λ de 550 nm. Los valores de absorbancia se corrigen por medio de los datos de regresión de la curva de albúmina para obtener la concentración de proteína.

2.8.4. Disección del cuerpo estriado

Después de 2.5 horas de la inyección i.p. de cobre (2 hr. después de la lesión intraestriatal), los animales se decapitaron, se cortaron los huesos craneales para separar la masa encefálica y se obtuvieron por medio de una disección precisa, el cuerpo estriado del hemisferio derecho (lado lesionado). Este procedimiento se realizó en no más de 5 minutos y el tejido disecado se mantuvo en un tubo de ensayo sobre hielo y protegido de la luz.

2.8.5. Extracción del L.C.R.

Después de 2.5 horas de la inyección i.p. de cobre (2 hr. después de la lesión intraestriatal), y con efecto del pentobarbital se mantuvo al animal anestesiado y en el aparato estereotáxico, para realizar un corte en la parte (dorsoventral) del cuello del animal y efectuar una punción al nivel de la segunda vértebra cervical. La punción se realiza entre las vértebras cervicales C₂ y C₃, en los espacios intracervicales y si la punción es correcta, el líquido cefalorraquídeo empezará a drenar.

2.8.6. Determinación de la actividad de Cp.

Fundamento: Fe(II) es transformado a Fe(III) en presencia de Cp. La reacción es detenida por la precipitación de proteínas con ácido perclórico. El Fe(III) es revelado con el reactivo de tiocianato y este complejo se puede medir a un máximo de absorbancia de 680 nm.

Se tomaron 20 μ L de L.C.R., y se le adicionaron 2 ml de buffer de acetatos (0.3 M pH 6.0) en un tubo de ensayo y se incubó durante 5 minutos a 30 °C; se le agregó 1 ml de la solución de sulfato de amonio ferroso 0.01 M, la muestra fue incubada durante 5 minutos más a 30 °C y la reacción se detiene con la adición de 2 mL de ácido perclórico 1.25 M. Después las muestras se centrifugaron en una centrifuga Beckman a 10000 g por 3 minutos, y el sobrenadante se analizó con un espectrofotómetro PERKIN ELMER LAMBDA 20 UV/VIS 450 nm.

2.8.7. Medición de GABA por HPLC

Siete días después de la lesión con QUIN, a cada uno de los animales se les administró un inhibidor de la glutamato descarboxilasa (GAD), ácido 3-mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg i.v.), para inhibir el incremento de GABA post mortem. Dos minutos después, los animales fueron sacrificados por decapitación y se realizó la disección del cuerpo estriado derecho (lado lesionado), homogenizarse con 15 volúmenes de la mezcla metanol-agua (85% v/v). Las muestras fueron centrifugadas (3000 g durante 15 minutos) y las alícuotas del sobrenadante fueron almacenadas a -5 °C hasta su análisis por Cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés). Los niveles de GABA fueron analizados por HPLC con detector de fluorescencia.

Para la reacción de derivatización en la columna de cromatografía se siguió este procedimiento: 100 mL de reactivo de OPA con la adición de 100 mL de tejido del sobrenadante; 1 minuto después, 20 μ L de la mezcla fueron inyectados con una jeringa Hamilton de 25 μ L en el cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer serie 3

B. Se utilizó una columna 100 x 4.8 mm Alltech Adsorbosphere OPA-HS con un tamaño de partícula de 3 μm . La fase móvil fue la solución A. La línea de gradiente fue hecha en dos etapas: incrementos de solvente B desde 10% hasta 65% en 15 minutos, y desde 65% hasta 99% en 5 minutos, regresando a 10 minutos en 5 minutos. La fluorescencia fue medida usando un detector de fluorescencia Beckman 157. La curva de calibración de GABA fue construida por inyecciones de concentraciones conocidas del derivatizado OPA-estándar de GABA en los 20 μL . Las concentraciones de GABA fueron obtenidas por interpolación en la curva de calibración.

2.9. Análisis estadístico

Los valores obtenidos de cada experimento fueron sometidos a la prueba estadística de ANOVA simple. Para los experimentos donde se demostró una diferencia significativa, se prosiguió con una prueba de TUKEY. A continuación se describe esta prueba estadística (Robert, 1960; Wayne 1996).

Prueba de TUKEY

Esta prueba es llamada también de la Prueba de la diferencia significativa honesta (hsd). En el desarrollo de las pruebas de comparación múltiple, un problema surge en estas, por los experimentos donde muchas comparaciones son hechas; ésta es la más certera en demostrar algunas diferencias en las significancias cuando mediciones iguales se muestran homogéneas (Robert, 1960; Wayne 1996).

Este problema dirigió al desarrollo de procedimientos donde son usados los números de errores asociados a los experimentos unitarios donde se observan diferencias falsamente declaradas sobre la significancia de procedimientos semejantes. Con un nivel del 5% de la prueba, el 5% de los experimentos dieron una diferencia significativa falsa y el 95 % no dió diferencias significativas, en los promedios, cuando las mediciones fueron homogéneas. Esto es llamado un experimento con errores proporcionales (Robert, 1960; Wayne 1996).

Los niveles de significancia están dados en la prueba de TUKEY como w procedimientos. El procedimiento consiste en la siguiente ecuación.

$$w = q_{\alpha}(P, n_2) s_X$$

De donde:

q_{α} se obtienen de tablas $\alpha = 0.05$ o $\alpha = 0.01$

P es el número de tratamientos

n_2 es igual al error de los grados de libertad

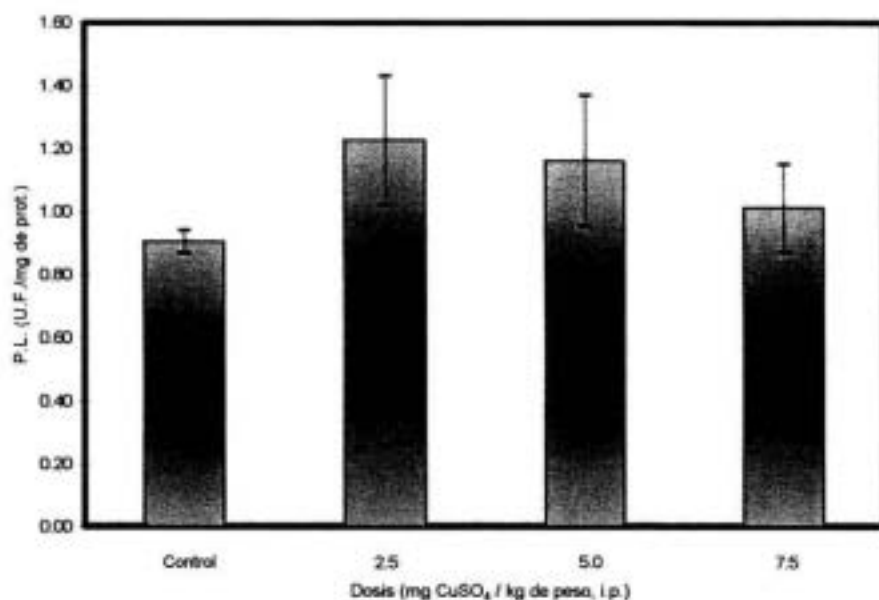
w es usado para el juicio de significancia de cada una de las diferentes observaciones.

En suma, la prueba de TUKEY es extremadamente fácil de aplicar desde los requerimientos de valores solos para juicios de significancia de tratamientos diferentes (Robert, 1960). Los resultados se muestran como la media más menos el error estándar de los 6 experimentos independientes, esto se presenta como gráficas de barras. Se consideró que existían diferencias significativas cuando se obtenía $p < 0.05$ o $p < 0.01$.

CAPITULO 3 RESULTADOS

3.1. Efecto del cobre i.p. sobre la P.L. en el cuerpo estriado

En la grafica 1 se puede observar el efecto del Sulfato de Cobre i.p. a diferentes dosis, sobre la PL del cuerpo estriado derecho en ratas administradas i.e. con 1 μ L SSI. El cobre no refleja diferencias significativas en la PL con respecto a la basal, después de un ANOVA simple; sin embargo, se observa un comportamiento de tipo dosis dependiente con respecto a los niveles decrecientes de la PL. La dosis de cobre de 7.5 mg/kg muestra una mortalidad aproximada del 40%, mientras que la dosis de 10 mg/kg muestra una mortalidad del 100% antes de poder medir la PL.

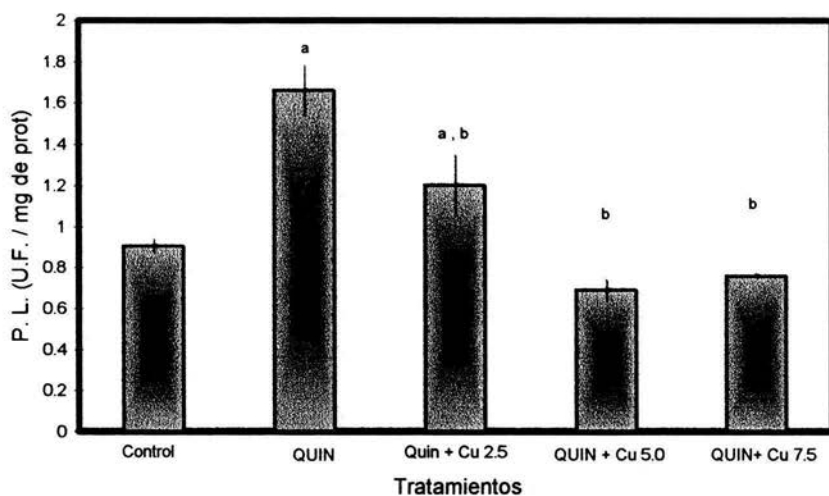


Gráfica 1. Efecto del CuSO₄ i.p. a diferentes dosis en la P.L. después de la inyección intraestriatal con S.S.I. La P.L. fue medida en el cuerpo estriado derecho después de 2 horas de la inyección CuSO₄. Cada barra representa la media \pm e.e. de 6 experimentos diferentes; no se encontraron diferencias significativas después de un ANOVA simple.

3.2. Efecto del cobre sobre la peroxidación inducida por el QUIN

La grafica 2 nos muestra el efecto del cobre i.p. sobre la PL inducida por el QUIN i.e. en el cuerpo estriado derecho de rata. El grupo de SSI i.p. + QUIN i.e. muestra una diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ por lo cual podemos decir que el QUIN aumenta la PL en el cuerpo estriado; sin embargo, la combinación de cobre + QUIN muestra un efecto protector de tipo dosis-dependiente. La dosis de 2.5mg/kg muestra diferencias significativas con respecto al control y al grupo de QUIN. A pesar de mostrar diferencias contra control, atenúa el daño producido por el QUIN. Las otras dosis no muestran diferencias significativas entre ellas, pero atenúan más significativamente el daño del QUIN que el grupo de 2.5 mg/kg.

Debido principalmente a la tasa de mortalidad de la dosis de 7.5 mg/kg (aproximadamente 40%), aunado a que esta dosis no muestra diferencias significativas con respecto a la dosis de 5.0 mg/kg, proponemos esta dosis como la ideal para los siguientes experimentos.



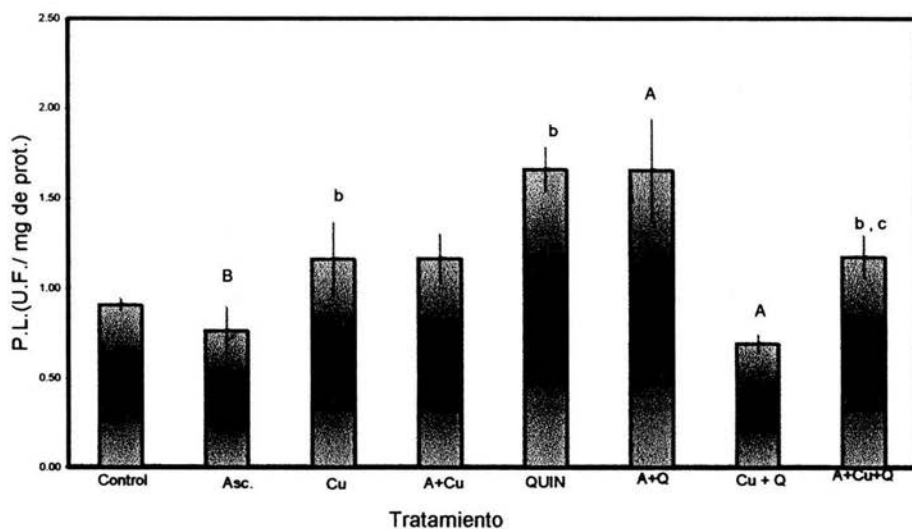
Gráfica 2. Se muestra el efecto del CuSO_4 , i.p. a diferentes dosis, sobre la PL inducida por el QUIN (240 nmol/ μL) i.e. en el cuerpo estriado, Cada barra representa la media \pm e.e. de 6 experimentos diferentes a) $p < 0.05$ diferencia vs control b) $p < 0.05$ diferencia vs QUIN. (ANOVA seguido de Tukey)

3.3. Efecto del cobre y del ácido ascórbico i.p. en la PL después de la administración de QUIN

Como ya se mencionó, el ácido ascórbico juega un papel muy importante dentro de las funciones naturales del cobre, por lo que pareció interesante investigar el efecto de esta vitamina dentro de los resultados hasta ahora obtenidos.

Como se puede observar en la grafica 3, el ácido ascórbico (Asc) no muestra ningún efecto dentro de la acción de cualquiera de las dos sustancias. El Asc muestra una diferencia significativa ($p < 0.01$) con respecto a control, pero no muestra diferencias con respecto al grupo tratado con cobre o con el de cobre + Asc, por lo que no creemos que tenga algún efecto dentro de la actividad del cobre, al menos en el cuerpo estriado.

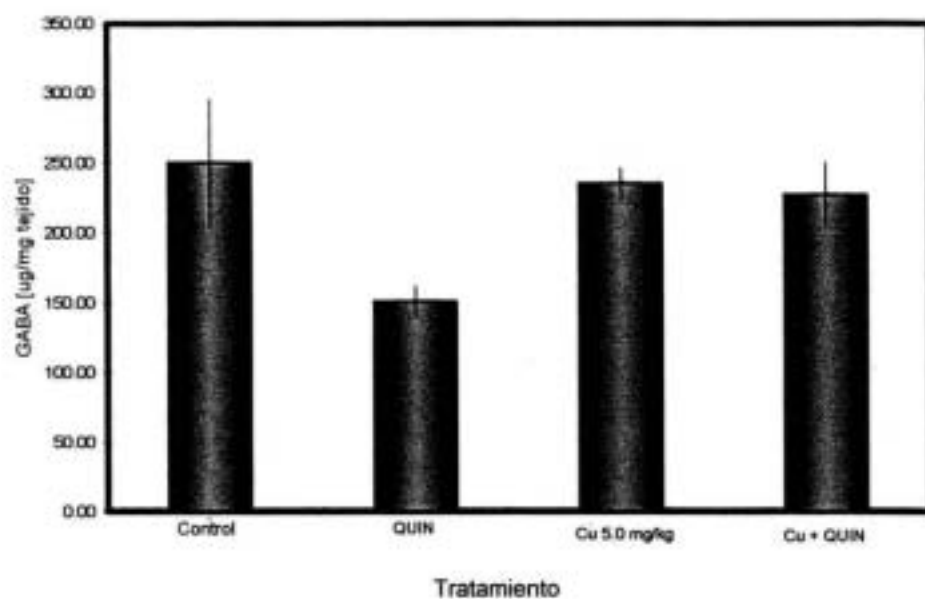
El grupo tratado con Asc+ QUIN muestra una diferencia significativa con respecto a control ($p < 0.05$), siendo los niveles de éstos no diferentes de los de QUIN; sin embargo, al aplicar los tres tratamientos, se demuestra el papel protector del cobre en una dosis de 5.0 mg / kg en la PL.



Gráfica 3. Se muestra el efecto de diferentes tratamientos en la PL del cuerpo estriado; Control, Asc (ácido ascórbico 500 mg / kg i.p.), CuSO₄ (5.0 mg / kg), Asc + CuSO₄ (500 mg/kg 5.0 mg/kg respectivamente, i.p.), QUIN (240 ng/uL, i.e.) Asc i.p. + QUIN i.e.; CuSO₄ i. p. +QUIN i.e; Asc+ CuSO₄ i.p. + QUIN i.e.; cada barra significa la media \pm e.e. de 6 experimentos diferentes, **A)** $p < 0.05$ diferencia vs control ; **b)** $p < 0.05$ diferencia vs QUIN; **B)** $p < 0.01$ diferencia vs QUIN; **c)** $p < 0.05$ diferencia vs Cu+QUIN. (ANOVA seguido de Tukey)

3.4. Efecto del cobre sobre los niveles de GABA en el cuerpo estriado después de la administración del QUIN.

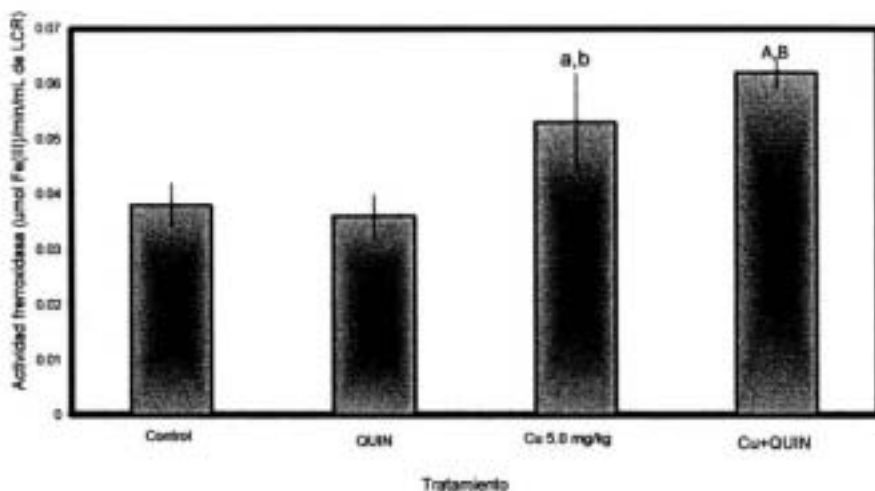
Como se puede observar en la grafica 4, no hay evidencias de que el tratamiento de cobre tenga algún efecto dentro de los niveles de GABA; llama la atención en la gráfica que casi se observa un efecto de recuperación de los niveles dentro de los tratamientos con cobre; sin embargo, esto no es significativo, aun que el tratamiento con QUIN si muestra una disminución en los niveles de GABA.



Gráfica 4. Se muestran los resultados de los niveles de GABA, determinados por HPLC, después de la administración de CuSO_4 i.p. (5.0 mg/kg) y QUIN (240 nmol/ μL); las barras representan la media \pm el e.e. de 6 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas después de un ANOVA simple.

3.5. Efecto del cobre sobre la actividad de la Cp después de la administración del QUIN.

Con respecto a los datos que se pueden observar en la gráfica 5, observamos que la actividad de la Cp en el grupo tratado con SSI i.p. y QUIN i.e. muestra una ligera inhibición dentro de la actividad ferroxidasa (-5% vs control 100%) de ésta enzima; sin embargo, esta no llega a ser estadísticamente significativa. Se observa un aumento en la actividad (39 % vs control) con el grupo tratado con Cu 5.0 mg/mg que es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a control y ($p < 0.05$) con respecto a QUIN; en el grupo tratado con Cu i.p. y QUIN i.e. se observa un aumento en la actividad que en cualquiera de los otros tratamientos (63% vs control) siendo estadísticamente significativo ($p < 0.01$) vs control y ($p < 0.01$) vs QUIN.



Gráfica 5. Se muestra el efecto del CuSO_4 i.p. sobre la actividad ferroxidasa de la Cp en LCR 120 minutos después de la administración de QUIN. Las barras representan la media de las actividades + e.e. de 6 experimentos independientes; a) $p < 0.05$ y A) $p < 0.01$ diferencia vs control; b) $p < 0.05$ y B) $p < 0.01$, diferencia vs QUIN (ANOVA seguido de Tukey).

CAPITULO IV DISCUSIÓN

Basándonos en el modelo experimental de la EH por inyección de QUIN en el cuerpo estriado de la rata (un agonista de receptores de tipo NMDA) para reproducir las características bioquímicas, conductuales e histopatológicas de la enfermedad (Beal y cols., 1986) se probó el efecto del CuSO_4 sobre la posible atenuación de los efectos neurotóxicos del QUIN.

La PL es un evento que ocurre comúnmente en el cerebro de los mamíferos debido a la gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados contenidos en el tejido neuronal. Algunos factores patológicos en el SN producen una excesiva activación de receptores de tipo NMDA, aumentando la generación de radicales libres, provocando PL como un índice de estrés oxidativo (Santamaría y Ríos, 1993).

En este trabajo nosotros evaluamos la PL, producida por una lesión intraestriatal con QUIN, sugiriendo que el efecto de la neurotoxicidad puede ser relacionado a la excitotoxicidad producida por la apertura masiva de los canales iónicos de Ca^{++} ; una sobre activación de estos receptores se refleja en un aumento en los niveles de Ca^{++} intracelular provocando entre otros procesos citotóxicos la generación de radicales libres, los cuales producen PL (Santamaría y Ríos, 1991).

Como se observa en los resultados (Gráfica 1) el cobre no tiene efecto significativo sobre la PL basal. Sin embargo, el QUIN provoca un aumento en la PL basal (Gráfica 2), por el mecanismo antes mencionado. Resultan interesantes los resultados observados con el tratamiento agudo de Cu, el cual atenúa el daño producido por el QUIN en el cuerpo estriado. Se puede predecir un bloqueo en la PL producida por el QUIN con un tratamiento agudo de Cu, proponiendo a este como un antagonista potencial de receptores para NMDA, esto se puede confirmar con los estudios realizados por Vlachová y cols.,(1996) en el cual evaluaron el efecto del cobre en la modulación de receptores de tipo NMDA en cultivos hipocámpales de ratón; por estudios de patch-clamp ellos analizaron la inhibición

de receptores NMDA, activados por algunos agonistas selectivos a estos receptores, por concentraciones de Cu^{2+} , sugiriendo que el cobre libre (Cu^{2+}) inhibe directamente los receptores de tipo NMDA, actuando como un antagonista no competitivo a los sitios de glutamato o glicina. Además, datos reportados en la literatura sugieren que el Cu puede tener un efecto inhibitorio en la síntesis del óxido nítrico, así como un efecto inhibitorio sobre receptores de glutamato en ciertas condiciones (Weiser y Wienrich, 1996)

Por lo anterior sugerimos que el cobre puede bloquear a los receptores de tipo NMDA que pueden ser activados por el QUIN, deteniendo la activación de estos receptores, la apertura de los canales de Ca^{++} con la correspondiente generación de radicales libres y la PL consecuente de estos eventos, esto basándonos en los resultados obtenidos que muestran un claro efecto protector del Cu en este parámetro bioquímico con una respuesta de tipo dosis dependiente entre las primeras dosis.

Tomando en consideración algunos reportes, donde el ácido ascórbico (500 mg/kg) bloqua los efectos del Cu en el hipotálamo de rata (cambios en las concentraciones de catecolaminas) (Messripour, 1988), se propuso un experimento alterno en el cual se pudiera observar el efecto del ascorbato sobre los resultados hasta el momento obtenidos. Los resultados obtenidos (gráfica 3) nos demostraron que en este caso, el ascorbato (500 mg/kg) en combinación con el Cu, no modifica significativamente ninguno de los efectos observados en la PL.

Se proponía que el ascorbato pudiera estar interfiriendo con el Cu cambiando su estado de oxidación de Cu^{++} a Cu^+ , con el consecuente cambio en la función del cobre; como ya se revisó, el cobre puede también participar en la reacción de Fenton, provocando un aumento en la generación de radicales libres, con un aumento en la PL; sin embargo, como se demostró al menos en el cuerpo estriado, los depósitos de cobre no se ven afectados por la administración de ascorbato.

Para continuar con el protocolo, se decidió trabajar sólo con la dosis de 5.0 mg/kg de CuSO₄ principalmente por que a una dosis mayor (7.5 mg/kg) mostró una alta mortalidad dentro de sus grupos (casi el 50%).

Otro parámetro que indica el daño producido por el QUIN en el cuerpo estriado es la disminución de los niveles de GABA después de la lesión, por lo que para demostrar la protección del CuSO₄ se evaluaron los niveles de GABA después de 7 días de la lesión; los resultados obtenidos demuestran que el CuSO₄ protege los niveles de GABA hasta la línea basal. Una posible explicación de estos resultados puede darse recordando el efecto de la dizolcipina, la cual actúa como antagonista para los receptores de tipo NMDA, provocando que no exista una sobre activación de los mismos; por lo tanto, este fenómeno no provoca una disminución en los niveles del neurotransmisor (Santamaría y cols., 1996). Por ello se puede proponer que efectivamente el Cu pudiera estar compitiendo por los sitios de unión del QUIN en dichos receptores, en un mecanismo similar al de un antagonista.

Para intentar entender mejor estos mecanismos es necesario recordar los estudios realizados por Weiser y Wienrich (1996), quienes estudiaron el efecto del Cu en receptores para glutamato de cultivos de neuronas corticales; ellos encontraron que el Cu puede inhibir la activación de los receptores para AMPA y para NMDA pero por mecanismos diferentes, parece ser que la inhibición para AMPA es de tipo irreversible; sin embargo, para receptores de tipo NMDA es fácilmente reversible, con una clara y marcada dependencia a la concentración de agonista, sugiriendo, que el efecto del cobre sobre el sitio de unión es de tipo no oxidativo, aunque está reportado que los receptores NMDA contienen un sitio modulador sensible a oxidación.

Por lo anterior se propone un mecanismo de acción del cobre en el cual este actúe como un antagonista para los receptores de tipo NMDA, aunque la PL

inducida por el QUIN puede ser consecuencia también de la inhibición de procesos enzimáticos, ya que el QUIN puede disminuir la actividad de algunas enzimas con función antioxidante (catalasa, súper oxido dismutasa, ceruloplasmina, etc.). Para evaluar otra posible explicación de los resultados obtenidos, se propuso evaluar la actividad de la Cp, ya que esta enzima además de ser antioxidante, es la principal proteína de transporte del Cu desde el hígado hasta el SNC. Después de evaluar la actividad de la Cp se encuentran diferencias significativas para los grupos evaluados, lo que sugiere una participación de eventos antioxidantes dentro de la protección mediada por cobre, sin embargo estos datos no aportan una explicación clara o concluyente en cuanto a la protección del Cu en estos eventos de toxicidad.

Después de analizar los resultados, podemos seguir proponiendo un mecanismo en el cual el Cu se comporte como un antagonista de los receptores para NMDA; sin embargo, estos datos no pueden ser concluyentes, además de recordar que los receptores de tipo NMDA pueden estar sobre activados en el EH, no se puede proponer un bloqueador de receptores para NMDA como tratamiento para esta enfermedad, ya que todos ellos tienen efectos secundarios. Simplemente se propone un posible mecanismo de acción alternativo en la enfermedad, apoyados en los resultados experimentales. La acción del Cu como antagonista sobre receptores para NMDA deberá ser probada en futuros estudios en el modelo de Huntington para QUIN

CAPITULO V CONCLUSIONES

El modelo de la EH producido por una inyección intraestriatal con QUIN ha sido postulado como una de las mejores herramientas para estudiar los posibles mecanismo de patogénesis, así como para probar compuestos que sean postulados como inhibidores del daño neurodegenerativo producido en el modelo; estos compuestos no deben de aumentar los estados de degeneración basal, por lo que lo primero en este trabajo fue demostrar que *i)* el CuSO_4 solo no aumenta la PL basal en el cuerpo estriado de la rata.

Por lo anterior y continuando el protocolo, se demostró que *ii)* el CuSO_4 atenúa el daño peroxidativo inducido por la inyección intraestriatal el QUIN, además de demostrar que *iii)* El ascorbato no interfiere en los efectos del CuSO_4 , observados después de la administración del QUIN.

Uno de los parámetros bioquímicos relacionados con la EH es la pérdida de las neuronas estriatales espinosas medianas las cuales están involucradas, entre otros procesos, en la producción de GABA, por lo que al pretender demostrar la protección del Cu resulta necesario evaluar este metabolito y observar la conservación de este tipo de cuerpos neuronales. En este trabajo se demostró que *iv)* el CuSO_4 ejerce un efecto protector sobre los niveles de GABA en el cuerpo estriado después de una inyección intraestriatal de QUIN. Después de estas observaciones se hace necesario investigar a) si existe realmente una conservación de las neuronas espinas medianas o quizá éste efecto esté regulado por otro tipo de proceso metabólico, además de b) tratar de elucidar cual es el posible mecanismo por el que se observa esta protección. En este trabajo continuamos sólo con la segunda línea de investigación proponiéndose un mecanismo de tipo enzimático, basado en la existencia de algunas enzimas que son dependientes (en estructura o función) de las concentraciones de Cu sérico, como es el caso de la ceruloplasmina, encontrando que *v)* la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina se ve inducida por la administración de CuSO_4 a pesar de la lesión con QUIN.

A pesar de que se observa una inducción en la actividad de la Cp, ésta no es suficiente para proponerla como el principal agente involucrado en el mecanismo de protección, además de que surge la posibilidad que el Cu pueda estar involucrado directamente con los receptores para NMDA, por lo que resulta necesario continuar con esta investigación, con la finalidad de esclarecer los mecanismos involucrados en este proceso, tratando siempre de dar evidencias que puedan resultar en un mejor entendimiento de los procesos patológicos de la EH.

BIBLIOGRAFIA

Albin RL, Young AB, Penney JB, Handelin B, Balfour R, Anderson KD, Markel DS, Tourtellotte WW, Reiner A: Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease: *N Engl J Med* 1990 322:1293-1298.

Aronin N, Looper PE, and Lorenz LJ: Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington's disease: *Annu. Neurology*. 1983 13:519-526

Bates GP, Mangiarini L, Mahal A, Davies SW.: Transgenic models of Huntington's disease: *Hum Mol Genet*. 1997 6(10):1633-7

Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Schwarcz KJ, and Martin JB: Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid: *Nature* 1986 321:168-171.

Beal MF, Matson WR, Swartz KJ, Gamache PH, Bird ED.: Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J Neurochem*. 1990 55(4):1327-39.

Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT.: Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin: 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993 13:4181-4192.

Beadle C, Mitchell H K and Nyc JF: Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophan in *Neurospora*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1947 33:155-158

Bender DA, McCreanor GM: The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1982 717(1):56-60.

Bird ED and Iversen LL: Huntington's chorea: Postmortem measurement of acid-decarboxylase, choline acetyltransferase and dopamine in basal ganglia: *Brain* 1974 97: 457-472

Bird ED: Chemical pathology in Huntington's disease: *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.*; 1980 20:533-551

Brouillet EP, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, et al: Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: *J. Neurochem* 1993: 60:356-359

Brouillet E, Hantraye P: Effects of chronic MPTP and 3-nitropropionic acid in nonhuman primates: *Curr Opin Neurol.* 1995 8(6):469-73.

Brouillet E., Condé Françoise, M. F. Beal and Philippe Hantraye: Replicating Huntington's Disease Phenotype in Experimental Animals: *Progress in Neur.*: 1999 59: 427-468

Bruyn MRP and Stoof JC; The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea: *Journal of the Neurological Sciences*; 1990, 95:29-38

Carlock L, Walker PD, Shan Y, Gutridge K.: Transcription of the Huntington disease gene during the quinolinic acid excitotoxic cascade: *Neuroreport.* 1995 6(8):1121-4

Carrasco LH and Mukherji CS: Atrophy of corpus striatum in normal male at risk of Huntington's chorea: *Lancet* 1986 1:1388-1389.

Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S: Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research: *Trends Neurosci.* 2001 24: 182-188.

Choi DW: Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death: *Trends Neurosci.* 1995 18(2):58-60.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system: *Neuron.* 1998 (8):623-34.

Collingridge GL, Lester RA: Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system: *Pharmacol Rev.* 1989 41(2):143-210.

Conneally PM: Huntington disease: Genetics and epidemiology: *American J. Genetics* 1984 36:506-526.

Connick JH, Heywood GC, Sills GJ, Thompson GG, Brodie MJ, Stone TW. Nicotinyllanine increases cerebral kynurenic acid content and has anticonvulsant activity. : *Gen Pharmacol.* 1992 23(2):235-9

Cook JS and Pogson CI: Tryptophan and glucose metabolism in rat liver cells: the effects of DL-6-chlorotryptophan, 4-chloro-3-hydroxiantranilic acid and pyrazinamide: *Biochem. J.* 1983 241:511-516

Davis GK, Mertz W. Copper. In: Mertz W. ed. Trace elements in human and animal nutrition 5th ed Vol 1 New York: Academic. Press. 1987:301-64

Dawbarn D, de Quidt ME and Mesón PC: Survival of basal ganglia neuropeptide Y and somatostatin neurons in Huntington's disease: *Brain Res.* 1985 340:251-260.

Decker RH, Brown RR, Price JM. Studies on the biological activity of nicotinylalanine, an analogue of kynurenine: *J Biol Chem.* 1963 238:1049-53.

De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ.: Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants.: *Epilepsy Res.* 1992 12(2):87-110.

During MJ, Heyes MP, Freese A, Markey SP, Martin JB, Roth RH. Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading. : *Brain Res.* 1989 476(2):384-7.

Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 1995 269:407-410.

El-Defrawy SR, Boegman RJ, Jhamandas K, Beninger RJ, Shipton L. Lack of recovery of cortical cholinergic function following quinolinic or ibotenic acid injections into the nucleus basalis magnocellularis in rats. : *Exp Neurol.* 1996 91(3):628-33.

Farber JL: The role of calcium in cell death: *Life Sci.* 1981 29(13):1269-95.

Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Sorey E and Beal MF: Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: *Histopatologic and neurochemical Characterization: Exp. Neur.* 1993 119:46-71

Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci.* 2002 22:1592-1599.

Fisher RS.; Gluatamate and epilepsy; *Neurotransmitters Epilepsy* 1991 11:131-45

Fisher LJ, Ray J: In vivo and ex vivo gene transfer to the brain.: *Curr Opin Neurobiol.* 1994 4(5):735-41.

Fridovich I. Superoxide dismutases: regularities and irregularities. : *Harvey Lect.* 1983-84;79:51-75.

Frim DM, Uhler TA, Short MP, Ezzedine ZD, Klagsbrun M, Breakefield XO, Isacson O. Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions.: *Neuroreport.* 1993 4(4):367-70.

Foster AC, Whetsell WO Jr, Bird ED, Schwarcz R. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in human and rat brain: activity in Huntington's disease and in quinolinate-lesioned rat striatum. : *Brain Res.* 1985 336(2):207-14.

Foster AC, White RJ and Schwarcz R: Synthesis of quinolinic acid by 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase in rat brain tissue in vitro: *J. Neurochem.* 1986 47:23-30

Gal EM, Armstrong JC, Ginsberg B. The nature of in vitro hydroxylation of L-tryptophan by brain tissue. : *J Neurochem.* 1966 13(8):643-54.

Gal EM, Sherman AD. L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. : *Neurochem Res.* 1980 5(3):223-39.

Gale JS, Bird ED, Spokes EG, Iversen LL and Jessel T; Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea: *J. Neurochem.* 1978 30:633-634

Garthwaite G, Garthwaite J. Amino acid neurotoxicity: intracellular sites of calcium accumulation associated with the onset of irreversible damage to rat cerebellar neurones in vitro. : *Neurosci Lett.* 1986 71(1):53-8.

Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, et. al. :A polymorphic DNA markergenetically linked Huntington's disease. *Nature* 1983 306:234-238.

Halliwell, B. and Gtleridge, J. M.: Oxygen toxicity radicals, transition metals and disease; *Biochemical J.* 1984 2129:1-4

Hartmann HA and Evenson MA; Deficiency of Copper Cause Neuronal Degeneration; *Medical Hypotheses* 1992 38:75-85

Hayden MR: Huntington's chorea. *Springer-Verlang* 1981

Hicks JJ; Bioquimica; McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V.: México D. F. 2000.

Heyes MP, Quearry BJ. Quantification of 3-hydroxykynurenine in brain by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. : *J Chromatogr.* 1988 428(2):340-4.

Heyes MP, Rubinow D, Lane C, Markey SP. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. : *Ann Neurol.* 1989 26(2):275-7.

Higuchi K, Hayaishi O.: Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan.: *Arch Biochem Biophys.* 1967 120(2):397-403.

Hirata F, Hayaishi O. New degradative routes of 5-hydroxytryptophan and serotonin by intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase. : *Biochem Biophys Res Commun.* 1972 47(5):1112-9.

Jansen KL, Faulk RL, Dragunow M, Synek BL: Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors—an autoradiographic study.; *Neuroscience.* 1990 39(3):613-27.

Jenkins BG, Koroshetz WJ, Beal MF and Rosen BR: Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized HNMR spectroscopy. *Neurology* 1993;43:2689-2695

Joseph MH, Hall-Tipping DL. The metabolism of a tryptophan load in rat brain and liver; the influence of L-alpha-methyldopa hydrazine (MK-486, Carbidopa). : *Biochem Soc Trans.* 1978 6(5):997-1000.

Joynt RJ., Lippincott Company J. B.. The Extrapyramidal System and Disorders of Movement. *Clinical Neurology* Vol.3 Chap.38 p,p 49-57 1990.

Kagi JH, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein.: *Biochemistry.* 1988 27(23):8509-15.

Keene CD, Rodrigues CM, Eich T, Chhabra MS, Steer CJ, Low WC. Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease.: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10671-6

Kido R: Kynurenine aminotransferase activity in human and other mammalian tissues. In *Progress in Tryptophan and Serotonine Research*, edit by HG Schlossberger et. al. pp 651-657, Walterde Gruyter, Berlin, Germany, 1984.

Kim JP, Choi DW.: Quinolate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience*. 1987 23(2):423-32.

Klatzo I. Cecile & Oskar Vogt: the significance of their contributions in modern neuroscience. : *Acta Neurochir Suppl*. 2003 86:29-32.

Koutouzis TK, Borlongan CV, Scorcia T, Creese I, Cahill DW, Freeman TB, Sanberg PR. Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects on locomotor behavior. *Brain Res*. 1994 ;646(2):242-6.

Lancelot, E., Callebert, J., Lerouet, Revaud, M. L., Boulou, R. G., Plotkine, M.; Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the basal hydroxyl radical production in the striatum of awake rats as measured by brain microdialysis; *Neuroscience Letters*, 1995; 20221-24.

Lapin IP.: Nicotinamide, inosine and hypoxanthine, putative endogenous ligands of the benzodiazepine receptor, opposite to diazepam are much more effective against kynurenine-induced seizures than against pentylenetetrazol-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav*. 1981 14(5):589-93

Linder MC: The biochemistry of copper: New York:Plenum 1991a

Linder MC: Nutritional and metabolism of trace elements. In: Linder MC. ed. *Nutritional biochemistry and metabolism* 2nd ed New York: Elseiver, 1991b :215-76

Linder MC and Hazegh-Azam M: Copper biochemistry and molecular biology; *Am. J. Clin. Nutr*. 1996 63:797S-811S.

Lipton, S.A., Sucher, N.J., Kaiser, P.K., Dreyer, E.B.: Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity.; *Neuron*. 1991 Jul;7(1):111-8. *Related Articles, Links*

Lombardi G, Moneti G, and Moroni F: Mass- fragmentographic identification and mesurement of the excitotoxin quinolinic acidin the rat brain. *Act. Pharmacol. Toxicol*. 1983 53 (suppl. 1):24

Long CL, Hill HN, Weinstock IM, Henderson LM. Studies of the enzymatic transformation of 3-hydroxyanthranilate to quinolate. : *J Biol Chem*. 1954 211(1):405-17.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lu YM, Zhang JT, Zhao FQ, Qin YF. Effects of Ca²⁺ antagonists on glutamate release and Ca²⁺ influx in the hippocampus with in vivo intracerebral microdialysis. : *Br J Pharmacol*. 1991 104(1):222-6.

Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M.: 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin.: *Can J Neurol Sci*. 1991 Nov;18(4):492-8

Maciejewski-Lenoir D, Jirikowski GF, Sanna PP, Bloom FE. Reduction of exogenous vasopressin RNA poly(A) tail length increases its effectiveness in transiently correcting diabetes insipidus in the Brattleboro rat.: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 90(4):1435-9.

Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Leach H, Davies SW, Bates GP. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996 87:493-506.

Martinez-Fong D, Rosales MG, Gongora-Alfaro JL, Hernandez S, Aceves J. NMDA receptor mediates dopamine release in the striatum of unanesthetized rats as measured by brain microdialysis.: *Brain Res*. 1992 595(2):309-15.

Mason ST, Fibiger HC. Interaction between noradrenergic and cholinergic systems in the rat brain: behavioural function in locomotor activity. : *Neuroscience*. 1979 4(4):517-25.

McGeer PL, McGeer EG, Fibiger HC.: Choline acetylase and glutamic acid decarboxylase in Huntington's chorea. A preliminary study.: *Neurology*. 1973 9:912-7.

McGeer EG, Singh E. Neurotoxic effects of endogenous materials: quinolinic acid, L-pyroglutamic acid, and thyroid releasing hormone (TRH). : *Exp Neurol*. 1984 86(2):410-3.

McMurray CT. Huntington's disease: new hope for therapeutics. *Trends Neurosci* 2001 24:S32-S38.

Menalled LB, Chesselet MF.: Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 23(1):32-9.

Moroni F, Lombardi G, Carla V, Moneti G. The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. : *Brain Res.* 1984 295(2):352-5.

Moroni F, Lombardi G, Robitaille Y, Etienne P. Senile dementia and Alzheimer's disease: lack of changes of the cortical content of quinolinic acid. : *Neurobiol Aging.* 1986 7(4):249-53.

Moroni F, Russi P, Gallo-Mezo MA, Moneti G, Pellicciari R. Modulation of quinolinic and kynurenic acid content in the rat brain: effects of endotoxins and nicotylalanine. : *J Neurochem.* 1991 57(5):1630-5.

Mostafa MH, El-Sewedy SM, El-Bassiouni EA, Abdel-Tawab GA. In vivo and in vitro studies on the effects of some phenothiazines and sulpiride on kynurenine metabolism. : *Biochem Pharmacol.* 1982 31(13):2227-30.

Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 1995 81:811-823.

Nicoll Roger A., Malenka Robert C., and Kauer Julie A.; Functional Comparison of neurotransmitter Receptor Subtypes in Mammalian Central Nervous System; *Physiological Rev.* 1990 70: 513-565

Noguchi T, Minatogawa Y, Okuno E, Nakatani M, Morimoto M. Purification and characterization of kynurenine-2-oxoglutarate aminotransferase from the liver, brain and small intestine of rats. : *Biochem J.* 1975 151(2):399-406

Okuno E, Schmidt W, Parks DA, Nakamura M, Schwarcz R. Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations. : *J Neurochem.* 1991 57(2):533-40.

Okuno E, Schwarcz R. Purification of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from rat liver and brain.; *Biochim Biophys Acta.* 1985 841(1):112-9.

Peet MJ, Curry K, Magnuson DS, McLennan H. Ca²⁺-dependent depolarization and burst firing of rat CA1 pyramidal neurones induced by N-methyl-D-aspartic acid and quinolinic acid: antagonism by 2-amino-5-phosphonovaleric and kynurenic acids. : *Can J Physiol Pharmacol.* 1986 64(2):163-8.

Perkins, M. N. and Stone, T. W.: An iontophoretic investigation of the actions of convulsant, kinurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain res.* 1982 147:184-187

Perkins MN, Stone TW. Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. : *J Pharmacol Exp Ther.* 1983 226(2):551-7.

Perkins, MN and Stone TW : Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res.* 1983a 259:172-176

Perkins MN and Stone TW: Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983b 226:551-557

Pearson S. J., Heathfield K. W. G., and Reynolds G. P.; Pallidal GABA y chorea in Huntington's disease. *Journal of Neural Transmission [GenSect]* 1990 81:214-246.

Peters, J.C., Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991: 294:345-358

Przyrembel H. Therapy of mitochondrial disorders.: *J Inherit Metab Dis.* 1987 10 Suppl 1:129-46.

Raymond D. Adams, M. A., M.D., Maurice Victor, M. D., Ropper, H. Allan, M.D., Principios de Neurología; 6ª edición México 1999 Mc. Graw-Hill Interamericana

Reddy PH, Williams M, Charles V, Garrett L, Pike-Buchanan L, Whetsell WO Jr, Miller G, Tagle DA. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet.* 1998 20(2):198-202.

Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., Amato, C. J., Penney, J. B. and Young, A. B.: Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1988. 85:5733-5737

Reynolds GP, Pearson SJ, Halket J and Sandler M: Brain quinolinic acid in Huntington's disease: *J. Neurochem. Res.* 1988 50:1959-1960

Robert GD Steel, James HT; Principles and procedures of statistics; Mc. Graw-Hill Book Company Inc. 1960 :109-111

Rubinsztein DC.: Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet.* 2002 18(4):202-9.

Sagratelya S.: NMDA antagonists: antiepileptic-neuroprotective drugs with diversified neuropharmacological profiles. *Pharmacol Res.* 1995 32(1-2):1-13

Santamaria Abel y Rios Camilo; MK-801, an N-methyl-d-aspartate antagonist, block quinolinic acid-induced peroxidation in rat corpus striatum. *Neuroscience Letters*, 1993; 159:51-54.

Santamaria del Angel Abel; Efecto de la administración sistémica de la D, L-Kinurenina y el probenecid sobre la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolinico en el cuerpo estriado de la rata, *Tesis de maestría Facultad de Ciencias UNAM* 1995.

Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein.: *Free Radic Biol Med.* 1993 Mar;14(3):325-37.

Schilling G, Coonfield ML, Ross CA, Borchelt DR. Coenzyme Q10 and remacemide hydrochloride ameliorate motor deficits in a Huntington's disease transgenic mouse model. *Neurosci Lett.* 2001 315(3):149-53.

Schwarcz R, Whetsell WO Jr, Mangano RM. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. : *Science.* 1983 219(4582):316-8.

Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO Jr, Kohler C.; Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.*; 1984 35(1):19-32.

Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell WO Jr.: 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 85(11):4079-81

Schwarcz R, Poeggeler B, Rassoulpour A, Ceresoli-Borroni G, Hodgkins PS Regulation of kynurenic acid levels in the developing rat brain. : *Amino Acids.* 1998 14(1-3):243-9.

Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr, et al. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide.: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 92(10):4452-6.

- Siesjo BK, Wieloch T. Cerebral metabolism in ischaemia: neurochemical basis for therapy. : *Br J Anaesth*. 1985 57(1):47-62.
- Spokes EGS: Neurochemical alteration in Huntington's chorea: A study postmortem brain tissue: *Brain* 1980 103: 179-210.
- Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents—is the bullet really magical? : *Science*. 1993 261(5124):1004-12.
- Stone TW, Perkins MN, Collins JF, Curry K. Activity of the enantiomers of 2-amino-5-phosphonovaleric acid as stereospecific antagonists of excitatory aminoacids. : *Neuroscience*. 1981 6(11):2249-52.
- Stone TW and Perkins MN.: Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS: *Eur. J. Pharmacol*. 1981 72:411-412
- Stone TW, Connick JH, Winn P, Hastings MH, English M Endogenous excitotoxic agents. : *Ciba Found Symp*. 1987 126:204-20.
- Stone TW and Burton NR: NMDA receptors and their endogenous ligands in vertebrate CNS: *Progr. Neurobiol*. 1988 30:333-368
- Stone TW.; Neuropharmacology of Quinolinic and Kinurenic Acids; *Pharmacological Reviews*; 1993 45:309-379
- Sperk, G.: Kainic acid seizures in the rat.: *Progress in Neurobiol*. 1992 42:1-32
- Tatter SB, Galpern WR, Hoogeveen AT, Isacson O.: Effects of striatal excitotoxicity on huntingtin-like immunoreactivity. *Neuroreport*. 1995 30;6(8):1125-9.
- Testa CM, Standaert DG, Landwehrmeyer GB, Penney JB Jr, Young AB.; Differential expression of mGluR5 metabotropic glutamate receptor mRNA by rat striatal neurons.; *J Comp Neurol*. 1995 354(2):241-52.
- Tortora GJ., Anagnostakos NP. Principios de Anatomía y Fisiología; 6ª edición HARLA México 1998. p.p. 447.

Torrans PR, Breslow L, Fielding JE. The role of universities in personal health improvement. : *Prev Med.* 1982 Jul;11(4):477-84.

Triggs WP, Willmore LJ.: In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe⁺⁺ injection. *J Neurochem* 1984 42:976-979.

Tsuzuki K, Iino M, Ozawa S. Change in calcium permeability caused by quinolinic acid in cultured rat hippocampal neurons. : *Neurosci Lett.* 1989 105(3):269-74.

Turski WA, Gramsbergen JB, Trautler H, Schwarcz R. Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine. : *J Neurochem.* 1989 52(5):1629-36.

Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Loschmann PA, Wachtel H.; Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature.* 1991 349(6308):414-8.

Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 28 No. 12 pp. 1685-1696, 2000

Verity MA. Neurotoxins and environmental poisons. : *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 1992 5(3):401-5.

Vincent SR, Johansson O, Hokfelt T, Skirboll L, Elde RP, Terenius L, Kimmel J, Goldstein M.: NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol.* 1983 ;217(3):252-63.

Vlachová V, Zemkova H y Vyklický L, Jr.; Copper Modulation of NMDA Responses in Mouse and Rat Cultured Hippocampal Neurons; *European Journals of Neuroscience*; 1996 8:2257-2264

Wagne W. Daniel; Bioestadística, Bases para el análisis de las ciencias de la salud; Editorial Limusa; 1996 5ª :728-737

Watkins JC, and Evans RH: Excitatory amino acid transmitters. : *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1981;21:165-204.

Weiser T. and Wienrich M.; The effects of copper ions glutamate receptors in cultured rat cortical neurons; *Brain Research*; 1996 742:211-218.

Westbrook GL: Glutamate receptor update.: *Curr Opin Neurobiol.* 1994 4(3):337-46.

Wolfensberger M, Amsler U, Cuenod M, Foster AC Whitsett WO Jr., and Schwarcz R.: Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue: *Neurosci. Lett* 1984 41:247-252

Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. A reversible mouse model of Huntington's disease. *Huntington's Disease Research Conference. Cambridge, MA USA 1999 13-15.*

Yamamoto A, Lucas, JJ, Hen R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 2000 101:57-66.

Yoneda Y, Ogita K. Heterogeneity of the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex in rat brain, as revealed by ligand binding techniques. : *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 259(1):86-96.

Zellin S, Liu J-P, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 1995 11:155-163.

Zentella PM, Corona GS y Saldaña BY. Toxicidad del oxígeno: *Papel de los Radicales Libres en la Peroxidación de Lípidos.* Vol. 13 No. 3 pp.87-93 1994.

Zwart LL de, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. : *Free Radic Biol Med.* 1999 26(1-2):202-26.