

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS TIPO NMDA Y EL
ÓXIDO NÍTRICO EN EL DAÑO OXIDATIVO
INDUCIDO POR LA HOMOCISTEINA EN
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q. F. B. AURELIO JARA PRADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL.

MÉXICO, D. F.



SEPTIEMBRE, 2004

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/0332/04

ASUNTO: Asignación de jurado

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL
Presente.

Por este conducto me permito comunicarle como Directora de Tesis del alumno Q.F.B. AURELIO JARA PRADO, quien desarrolló el trabajo de tesis titulado: " PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GLUTAMATERGICOS TIPO NMDA Y EL OXIDO NÍTRICO EN EL DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR LA HOMOCISTEINA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA", que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 3 de mayo del año en curso, asigno el jurado para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el alumno antes mencionado tiene los méritos para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

GRADO, NOMBRE COMPLETO

PRESIDENTE	DRA. ANNIE PARDO SEMO
PRIMER VOCAL	DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBBAT BONAPARTE
SEGUNDO VOCAL	DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
TERCER VOCAL	DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
SECRETARIO	DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL
SUPLENTE	DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA
SUPLENTE	DRA. MARÍA ESTHER JIMÉNEZ CAPDEVILLE

Sin más por el momento y en espera a su pronta respuesta, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 11 de mayo del 2004.
JEFE DE LA DIVISIÓN

DR. DENI CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS



RVDC/ASRIneg.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis Dr. Abel Santamaría Del Angel, por la confianza, la enseñanza y la motivación que me transmitió e hicieron posible la culminación de esta etapa de mi formación profesional.

A mi comité tutorial la Dra. Annie Pardo Semo y a la Dra. Ma. Fanjul Peña por el tiempo, los acertados comentarios y recomendaciones que fueron parte fundamental para la realización de este trabajo. Gracias.

A los miembros del jurado:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia

Dra. Marisol López López

Dra. María Esther Jiménez Capdeville

Dra. Ma. Fanjul Peña

Dra. Annie Pardo Semo.

A la Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela por todo el apoyo otorgado.

Al personal del Laboratorio de Genética del INNyN.

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México y al personal docente cuya labor invaluable fincaron los cimientos de mi formación profesional. Gracias.

DEDICATORIAS

A mi esposa Guadalupe,
por tu amor, comprensión y apoyo incondicional, por tus palabras
siempre motivantes para seguir adelante y por los momentos buenos y
malos que hemos pasado.

A mi hijo Israel,
que con tu llegada a mí vida en un momento difícil, me diste las
fuerzas necesarias para superarlo, eres la motivación junto con tu
mamá para seguir adelante cada día.

A ambos los amo.

A mis padres,

Julio y Julia

Gracias.

ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
CBS	Cistationina- β -Sintetasa
Glu	Glutamato
GSH-Px	Glutación peroxidasa
HCY	Homocisteína.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
F ₂ SO ₄	Sulfato de fierro
KA	Ácido kaínico
L-NAME	N ω -metiléster nitro-L-arginina
L-NARG	N ω -nitro-L-arginina
NAC	N-Acetil-L-cisteína
MK-801	Dizolcipina
MTHFR	Metiléntetrahidrofolato reductasa
3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
7-NI	7-Nitroindazol
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Óxido nítrico
PL	Peroxidación de lípidos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SH	Grupo sulfihídrido
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SON	Sintasa del óxido nítrico
S-NT	S-nitrosotioles.
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
RL	Radicales Libres

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
1 Introducción.....	1
1.1 Metabolismo de la Homocisteína.....	2
1.1.1 Cistationina - β -Sintasa (CBS).....	4
1.1.2 Metiléntetrahidrofolato Reductasa (MTHFR).....	5
1.2 Homocisteína y enfermedad.....	6
1.3 Homocisteína, género y edad.....	8
1.4 Posibles mecanismos de daño vascular.....	9
1.4.1 Homocisteína y radicales libres.....	11
1.4.2 Estrés oxidativo y radicales libres.....	13
1.5. Lipoperoxidación.....	14
1.5.1 El proceso de la lipoperoxidación.....	15
1.6 Antioxidantes.....	17
1.6.1 N-acetil-L-cisteína.....	18
1.7 Receptores tipo NMDA.....	19
1.7.1 Homocisteína y excitotoxicidad.....	21
1.7.2 Dizocilpina (MK-801).....	22
1.8 Óxido Nítrico.....	23
1.8.1 Síntesis del óxido nítrico.....	25
1.8.2 Inhibidores de la SON.....	27
1.8.3 Homocisteína y óxido nítrico.....	28
1.8.4 Homocisteína, óxido nítrico y función endotelial.....	30
2.0 Hipótesis.....	32
3 Objetivos.....	33
3.1 Objetivo General.....	33
3.2 Objetivos Particulares.....	33
4 Materiales y métodos.....	34
4.1 Animales.....	34
4.2 Reactivos.....	34
4.3 Metodo <i>In vitro</i>	35

4.3.1	Aislamiento de sinaptosomas.....	37
4.3.2	Técnica de TBARS.....	37
4.3.3	Determinación de proteínas (Técnica de Bradford).....	38
4.4	Método <i>In vivo</i>	38
4.4.1	Evaluación conductual.....	39
4.4.2	Ensayo de productos lipídicos fluorescente.....	41
4.5	Análisis estadístico.....	41
5	Resultados <i>in vitro</i>	42
5.1	Curva- dosis respuesta de la lipoperoxidación inducida por la homocisteína.....	42
5.2	Efecto comparativo de la lipoperoxidación inducida por la homocisteína contra otras toxinas.....	43
5.3	Efecto del MK-801 y de la N-acetilcisteina, sobre la lipoperoxidación inducida por la HCY.....	44
5.4	Efecto de los inhibidores de la SON sobre la lipoperoxidación inducida por la HCY.....	45
6	Resultados <i>in vivo</i>	47
6.1	Manifestaciones conductuales en los grupos tratados con diferentes fármacos.....	47
6.2	Tiempo de latencia para CTEG en el grupo tratado con HCY.....	49
6.3	Lipoperoxidación inducida por la HCY en diferentes regiones cerebrales de la rata.....	50
7	Discusión.....	51
7.1	Lipoperoxidación inducida por la homocisteína.....	51
7.2	Homocisteína y excitotoxicidad.....	52
7.3	Lipoperoxidación inducida por homocisteína e inhibición de la óxido nítrico sintasa.....	53
7.4	Homocisteína y alteraciones conductuales.....	56
7.5	Homocisteína, lipoperoxidación y conducta.....	57
8	Conclusiones.....	60
9	Bibliografía.....	64

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto del aminoácido homocisteína (HCY) utilizando un modelo de lipoperoxidación (LP), un mecanismo de neurotoxicidad oxidativa en sinaptosomas de cerebro de rata. La LP se determinó utilizando como marcador la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas después de cada tratamiento en los sinaptosomas expuestos a HCY. Además, se estudió el efecto de la HCY sobre el comportamiento en ratas administradas sistémicamente con esta toxina y la posible correlación con la LP en diferentes áreas cerebrales.

Los resultados indicaron un incremento de la LP en los sinaptosomas dependiente de la concentración de HCY (5-1000 μM). Cuando se compararon a concentraciones equimolares (100 μM) con otros agentes oxidantes, el poder oxidativo que mostró la HCY resultó menor al presentado por el oxidante sulfato ferroso, similar al producido por el glutamato (Glu) y a la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico, y más alta que la presentada por los agonistas ácido kaínico (KA) y ácido quinolínico (QUIN). El antagonista del receptor para NMDA (rNMDA), el MK-801 bloqueó completamente la LP inducida por la HCY a concentraciones entre 5 a 1000 μM , mientras el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), resultó menos efectivo, alcanzando su protección contra la LP inducida por la HCY a concentraciones más altas (400 and 1000 μM). Se estudió también el efecto de tres inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (SON), 7-nitroindazol (7-NI), N ω -nitro-L-arginina (L-NARG) y N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) sobre la LP inducida por HCY, ambos inhibidores inespecíficos (L-NARG y L-NAME) disminuyeron más efectivamente la LP que el inhibidor neuronal específico (7-NI). Estos resultados muestran que concentraciones submilimolares de HCY pueden inducir daño oxidativo en terminales nerviosas, y este efecto involucra la estimulación de rNMDA, activación de la SON y la formación de radicales libres.

Por otro lado, aunque hubo cambios en el patrón conductual en la administración sistémica de HCY en ratas, no se encontró ninguna asociación con los niveles de lipoperoxidación medidos en las diferentes áreas del cerebro (hipocampo, hipotálamo, corteza, tallo cerebral, cerebelo y estriado), por lo que se sugiere que deben emplearse otras condiciones para el mismo modelo *in vivo* para determinar si existe una asociación.

ABSTRACT

The effect of homocysteine (HCY) on lipid peroxidation (LP), a current mechanism of oxidative neurotoxicity, was investigated in rat brain synaptosomes. LP was assessed by measuring the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) formed from synaptosomal fractions following HCY treatment. Increasing HCY concentrations (5-1000 μM) enhanced the TBARS formation in brain synaptosomes in a concentration-dependent manner. When compared at equimolar concentrations (100 μM), the oxidative potency of HCY resulted lower than that of the oxidant agent ferrous sulfate, similar to that produced by glutamate (Glu) and the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, and higher than that of the Glu agonists, kainate and quinolinate. The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) antagonist MK-801 completely blocked the HCY-induced LP at concentrations between 5 to 1000 μM , whereas the well-known antioxidant N-acetylcysteine (NAC) was less effective, but still protective against the HCY oxidative toxicity at higher concentrations (400 and 1000 μM). Three nitric oxide synthase (NOS) inhibitors - 7-nitroindazole (7-NI), N ω -nitro-L-arginine (L-NARG) and N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) - were also tested on HCY-induced LP at increasing concentrations. Both non specific NOS inhibitors (L-NARG and L-NAME) decreased more effectively the HCY-induced LP than did the selective neuronal NOS inhibitor, 7-NI. These results show that submillimolar concentrations of HCY can induce oxidative injury to nerve terminals, and this effect involves NMDAr stimulation, NOS activation and associated free radicals formation.

On the other hand, although there were important changes in the behavioral tests after the systemic administration HCY in rats, we did not find any association with lipoperoxidation levels, which were measured in different areas (hippocampus, hypothalamus, cortex, striatum, brain stem and cerebellum). Therefore the toxic model evoked by HCY under in vivo condition must be investigated with new experimental conditions in order to search for a possible correlation between behavioral and biochemical changes.

1.- INTRODUCCIÓN.

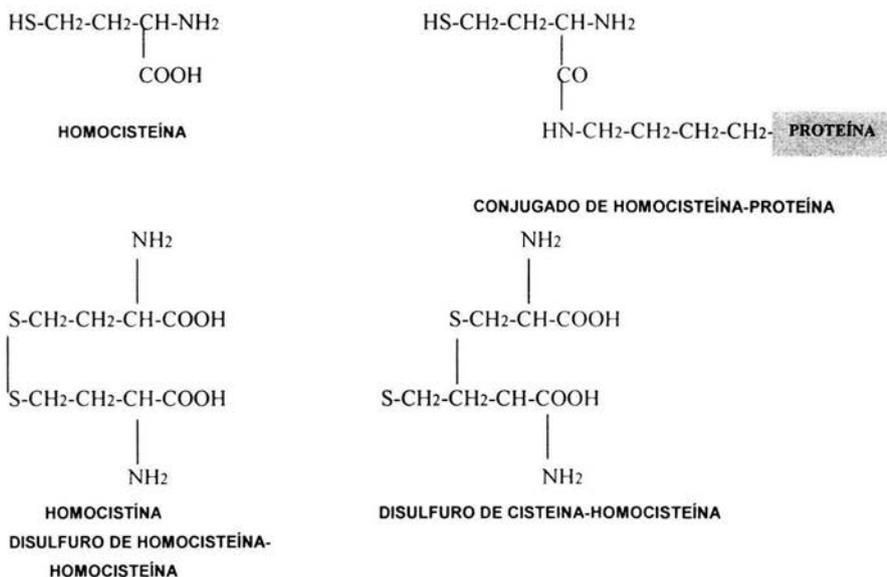
Las enfermedades vasculares se han convertido en un serio problema de salud pública y son causa frecuente de mortalidad en varios países. La hiperhomocisteinemia moderada ha sido identificada como un factor de riesgo independiente en enfermedades cardiovasculares, trombosis y defectos del cierre del tubo neural (Engbersen y cols.,1995; Malinow,1995; Durand y cols.,2001).

La homocisteína (HCY) es un aminoácido que se encuentra en el organismo y que es de gran interés clínico. Este aminoácido fue originalmente identificado a principios de los años 60's del siglo pasado como un metabolito urinario en pacientes con homocistinuria (Mudd y cols.,1995). La concentración de Homocisteína plasmática encontrada en las poblaciones normales es de 5 a 15 nmol/ml, Sin embargo, una elevación moderada entre 15 a 50 nmol/ml se presenta en la población con hiperhomocisteinemia (Bellamy y McDowell,1997) y estos niveles pueden alcanzar concentraciones de hasta 200 nmol/ml en pacientes con homocistinuria (Malinow,1990). Se han descrito diversas anormalidades en las enzimas que controlan el metabolismo de la HCY en los sujetos que presentan elevaciones de la HCY, principalmente alteraciones de la enzima cistationiona β .sintetasa (CBS) la cual regula uno de los pasos tempranos en la vía de la transulfuración de la HCY a cisteína. Por otro lado, esta la enzima 5,10-Metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la cual proporciona el substrato para la remetilación de la HCY a metionina (Malinow,1990), así como las deficiencias en las vitaminas B6, B12 y de folatos, cuya ingesta diaria se encuentra por debajo de los estándares recomendados en un gran porcentaje de la población (Stampfer y cols,1995).

1.1. METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA

La homocisteína (HCY) es un aminoácido que contiene un grupo tiol, que se origina metabólicamente mediante la desmetilación de la metionina. Este es un aminoácido esencial que, además, de ser precursor y componente de péptidos y proteínas, desempeña una importante función metabólica al participar en un sistema de transferencia de grupos metilos (Fig.1) (Menéndez y Fernández-Brito, 1999).

Fig. 1. Molécula de la homocisteína y sus formas conjugadas.



La presencia del grupo tiol de la HCY la hace una molécula fácilmente oxidable en el organismo, confiriéndole la posibilidad de llevar a cabo múltiples interacciones, y por lo tanto tomar diversos destinos, formando mezclas disulfuro con otras moléculas de HCY para formar homocistina, reaccionando con la cisteína para formar disulfuros mixtos de homocisteína y cisteína, o reaccionando con residuos

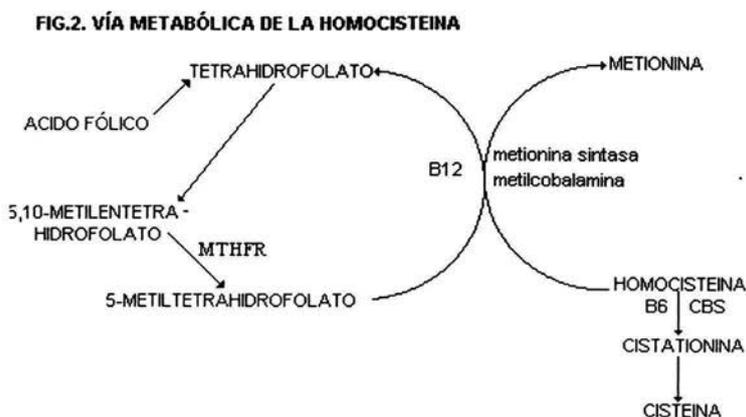
de cisteína de péptidos y proteínas, principalmente albúmina, a ésta última variante se le conoce como HCY ligada a proteína (Fig 1). Su forma conjugada con otros aminoácidos representa del 10 al 20 % del total en el organismo y la HCY ligada a proteínas representa entre 70 y 90 %, mientras que la forma libre o reducida se encuentra entre 1 a 2% (Jacobsen,1998; Welch y Loscalzo,1998). Tanto a la forma libre como a la forma conjugada se les denomina homocist(e)ina (Malinow, 1990); sin embargo, existe controversia al respecto (Menéndez y Fernández-Brito, 1999)

Se han descrito múltiples alteraciones en diferentes enzimas que controlan el metabolismo de la HCY en sujetos que presentan homocisteinemia. La HCY se encuentra en la intersección de dos vías metabólicas, la transulfuración y la remetilación. La vía de la transulfuración representa la alternativa en el caso de que la metionina se encuentre en exceso relativo y no se requiera su recuperación: la HCY se condensa con la cisteína para formar cistationina, reacción que es catalizada mediante la enzima cistationina- β -sintetasa (CBS) (EC 4.2.1.22) la cual es dependiente de vitamina B6 y fosfato de piridoxal. Posteriormente, la cistationina se hidroliza mediante la enzima γ -cistationasa (EC4.4.1.1) para dar cisteína y α -cetoglutarato, y finalmente la cisteína es catabolizada oxidativamente a sulfato y dióxido de carbono (Menéndez y Fernández-Brito,1999; Miner y cols., 1997).

El gen de la CBS se encuentra localizado en el cromosoma 21, específicamente en la región 21q22.3 (Munke y cols.,1998). La CBS es una molécula tetramérica con subunidades de 63 Kda cada una y posee una afinidad por dos sustratos: la HCY y la serina, así como a tres ligandos adicionales: fosfato de piridoxal, un activador alósterico de la S-adenosilmetionina y el grupo hemo cuya función se desconoce (Kraus,1994).

La metionina se genera en cantidades importantes por la vía de la remetilación de la HCY, una reacción catalizada por la enzima metiltetrahydrofolato Homocisteína metiltransferasa, también conocida como metionina sintetasa. Esta reacción enzimática requiere a la enzima metiléntetrahydrofolato reductasa (MTHFR; EC 1.1.1.68), la cual es una flavoproteína que cataliza la reducción del

5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que es la forma más abundante de los folatos en el organismo y donador de grupos metilos para la remetilación de la HCY a metionina. Esta reacción es catalizada por la enzima metionina sintasa y es dependiente de vitamina B12 (Mudd y cols.,1995; Harmon y cols,1996; Miner y cols,1997) (Fig.2).



1.1.1 CISTATIONINA- β -SINTETASA (CBS).

Alteraciones en el gen que codifica para la CBS son la causa de la homocistinuria clásica en sujetos heterocigotos, siendo una enfermedad con un patrón de herencia autosómico recesivo y con una prevalencia estimada que va desde 1:200,000 y hasta 1:350,000 (Mudd y cols.,1995), y se caracteriza por presentar elevadas concentraciones de HCY y metionina en sangre y orina (Finkelstein y cols.,1964).

En 1999 se estableció que el gen de la CBS presentaba 92 diferentes mutaciones plenamente identificadas en 310 alelos de pacientes con homocistinuria, los cuales fueron evaluados en más de una docena de laboratorios de todo el mundo, aunque la mayoría de las mutaciones fueron sin sentido o mutaciones privadas que ocurrían en una o muy pocas familias (Krauss,1999).

La homocistinuria es una entidad multisistémica, en donde las manifestaciones más frecuentes abarcan al sistema nervioso central, sistema circulatorio, sistema esquelético y al sentido de la vista. Los niveles plasmáticos de HCY pueden alcanzar niveles tan altos como 500 $\mu\text{mol/L}$. (Stein y McBride,1998).

1.1.2 METILÉNTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR).

La deficiencia de la MTHFR es el error más frecuente en el metabolismo de los folatos. Es una enfermedad autosómica recesiva cuyo gen responsable que codifica para la enzima se encuentra localizado en el cromosoma 1 en la región 1p36.3 (Goyette y cols.,1994). Hasta el momento se han identificado 24 mutaciones en el gen de la MTHFR (Sibani y cols.,2000).

Los individuos con una deficiencia en la MTHFR presentan una patología vascular similar a la encontrada en aquellos pacientes que tienen una deficiencia en la CBS, además pueden presentar alteraciones neurológicas y retraso mental. Las mutaciones presentes en el gen de la MTHFR puede producir una deficiencia moderada de la enzima que resulta en una moderada homocisteinemia. La severidad de las manifestaciones clínicas, así como el desarreglo bioquímico, dependerán del grado de la deficiencia en la enzima. Kang y cols. en 1988, reportaron una nueva variante termolábil de la MTHFR que se encuentra asociada con un incremento de Homocisteína en plasma, aunque Goyette y Rozen, (2000), presentaron evidencia de que el polimorfismo C677T influye en la severidad de la homocistinuria causada por mutaciones en otra parte del gen.

Frosst y cols., en 1995, identificaron en el gen que codifica para la enzima MTHFR una sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 que

convierte una alanina en valina. Esta mutación genera un sitio de restricción reconocido por la endonucleasa *HinfI*; la que permitió a Frosst analizar 114 cromosomas de sujetos Franco-Canadienses encontrando una frecuencia del 0.38. Las formas homocigota y heterocigota se han relacionado con una reducción de la actividad de la MTHFR. La frecuencia para homocigotos en esta mutación se encuentra presente entre un 9 a un 17% de la población, mientras que la frecuencia para heterocigotos se encuentra entre 30 a 41% de la población general (Kang y cols.,1991).

1.2 HOMOCISTEÍNA Y ENFERMEDAD.

McCully, en el año de 1969, fue el primero en reportar a un niño moribundo con homocistinuria, cistatinuria y aciduria metilmalónica secundarias a anomalías del metabolismo de cobalamina; las lesiones que presentaban eran similares a las que presentaban los pacientes con una deficiencia de la enzima CBS. Estas observaciones sugirieron que la elevada concentración de HCY en plasma que presentaban los pacientes con homocistinuria era responsable del desarrollo de enfermedades oclusivas arteriales (Selhub y cols,1993; Welch y Loscalzo,1998). Subsecuentes investigaciones han confirmado la hipótesis de McCully, y está quedando claro que la hiperhomocisteinemia es un factor independiente de riesgo para desarrollar aterosclerosis y aterotrombosis (Welch y loscalzo,1998). En un estudio realizado en pacientes con enfermedad arterial oclusiva periférica y cerebral de inicio temprano, se encontró que 26 de ellos presentaban concentraciones elevadas de HCY (Brattstrom y cols.,1990). El resultado de varios estudios, tanto retrospectivos y caso-control, ha establecido que la hiperhomocisteinemia moderada está asociada con el incremento en el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, cerebral y vascular periférica. Kang fue uno de los primeros investigadores en señalar que una variante termolábil de la MTHFR era un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (Kang y cols,1988). A partir de ahí, varios estudios han señalado a la

hiperhomocisteinemia como un factor independiente para desarrollar enfermedades vasculares, principalmente a las causadas por la mutación C677T del gen de la MTHFR. En un meta-análisis se identificaron 13 estudios en los cuales se establece la relación de las concentraciones plasmáticas de HCY y de los diferentes genotipos de la mutación C677T en la MTHFR. En 23 estudios caso-control que comprenden 5869 pacientes con enfermedades vasculares y 6644 sujetos controles, se encontró que los pacientes que eran homocigotos para esta mutación mostraban niveles más altos de HCY que los que no presentaban la mutación. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes y los controles en la frecuencia del alelo mutado que fue de un 34% y 33.8%, respectivamente; o entre el genotipo homocigoto de la mutación (11.9% y 11.7%, respectivamente). Por otra parte, en el análisis de 23 estudios llevados a cabo en pacientes con enfermedad vascular, se encontró un riesgo relativo de 1.12; con lo que se concluía que, aunque la mutación C677T de la MTHFR es la mayor causa de hiperhomocisteinemia moderada, ésta no incrementa el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y que la hiperhomocisteinemia que presentan los pacientes frecuentemente con enfermedad vascular no está relacionada casualmente con la patogénesis de la enfermedad (Brattstrom y cols.,1998).

En una revisión de todos los estudios epidemiológicos reportados de 1965 a 1999, sobre la participación de la homocisteína como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, se concluye que, aunque existe una gran evidencia epidemiológica entre la asociación de riesgo cardiovascular y el incremento en los niveles plasmáticos de HCY, no todos los estudios resultan ser consistentes, y que se debe de demostrar que disminuyendo los niveles de Homocisteína en el plasma, ésto resultará en una reducción en el riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Eikelboom y cols.,1999).

En los últimos años, se han publicado varios reportes referentes a la posible participación que tiene la HCY en la patogénesis de ciertas enfermedades. Breteler en el 2000, en un estudio de tipo epidemiológico llevado a cabo para buscar factores vasculares en la enfermedad de Alzheimer, menciona que la HCY

podría estar jugando un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Breteler, 2000).

1.2. HOMOCISTEÍNA, GÉNERO Y EDAD.

Existen una serie de estudios tanto transversales como prospectivos, llevados a cabo en gente joven y de mediana edad que han mostrado la existencia de una asociación entre los niveles plasmáticos de HCY y el incremento en el riesgo de infarto al miocardio (Boushey y cols.,1995; Graham y cols.,1997; Hoogeveen,1998; Stampfer,1992; Perry, 1995). Sin embargo, otros estudios no concuerdan con esta asociación (Alfthan y cols.,1994).

En un estudio realizado por Selhub, para comparar los niveles plasmáticos entre la población joven y la adulta mayor, encontró que la población adulta mayor presentan niveles mayores de HCY plasmática que la gente joven y que además es dependiente de las concentraciones plasmáticas de vitamina B12 y B6. Por otra parte, también encontró que los hombres presentan niveles plasmáticos más altos de HCY que las mujeres y que tal vez esto sea a causa de las bajas concentraciones plasmáticas de vitamina B6 y B12 que presentaban (Selhub y cols.,1993).

En otro estudio realizado en pacientes con enfermedad cardiovascular, se apoyó el concepto de que la edad y otros factores de riesgo pueden modular la asociación entre los niveles de HCY y el riesgo de enfermedad vascular (Stehouwer y cols.,1998).

1.4 POSIBLES MECANISMOS DE DAÑO VASCULAR POR LA HOMOCISTEÍNA.

Existe un gran interés en la propuesta de que una elevación moderada de HCY plasmática puede promover el desarrollo de enfermedad vascular. Algunos estudios llevados a cabo de tipo epidemiológicos han confirmado que moderadas elevaciones en la concentración de HCY en el plasma se encuentran asociadas con un incremento en el riesgo para desarrollar enfermedad aterosclerótica, ya sea coronaria, periférica y cerebral o trombosis venosa (Boushey y cols.,1995; den Hijer y cols.,1996). Las anomalías asociadas con hiperhomocisteinemia llevan a un ambiente protrombótico y proaterogénico. Estas alteraciones incluyen un daño celular endotelial, el cual es el evento inicial en el desarrollo de aterosclerosis, manifestado como una alteración en la vasodilatación dependiente del endotelio; un incremento en la agregación plaquetaria relacionada con un aumento en la síntesis de tromboxano A₂ y una disminución en la síntesis de prostaciclina, y por último una alteración en la cascada de coagulación, tal como la activación de factores como el V, X, y XII, y una inhibición de anticoagulantes naturales, tales como trombina III y factor C (Tabla 1) (Stein y McBride,1998).

Tabla 1. Hallazgos fisiopatofisiológicos de la hiperhomocisteinemia.

<p>Daño celular endotelial Alteración en la vasodilatación dependiente del endotelio Alteración del activador del plasminógeno tisular endógeno Incremento en la proliferación de músculo liso</p> <p>Incremento en la agregación plaquetaria Incremento en la síntesis de tromboxano A₂ Disminución en la síntesis de prostaciclina</p> <p>Alteraciones de la fibrinólisis Activación de factores V,X y XII Inhibición de antitrombina III y Factor C Aumento de la unión entre lipoproteína(a) y fibrina</p>
--

Aunque los mecanismos por lo cuales la HCY o sus metabolitos provocan daño vascular no son completamente entendidos, la toxicidad directa de la HCY sobre endotelio ha sido reportada en varios estudios *in vivo*. Un estudio realizado en monos babuinos a los cuales se les administró HCY-tiolactona durante un período de 5 días demostró que los monos presentan una descamación endotelial y que cuando la administración se prolonga durante 3 meses se producen lesiones fibromusculares excéntricas las cuales contienen lípidos intracelulares y células espumosas, semejantes a las lesiones ateroscleróticas en humanos. También se ha demostrado que la HCY tiene la capacidad de incrementar la síntesis de DNA en células vasculares de músculo liso consistente con las lesiones ateroscleróticas tempranas y con la inducción de estas células a proliferar mientras impiden la regeneración de células endoteliales (Boushey y cols.,1995). La HCY se une a proteínas plasmáticas formando uniones disulfuro en los residuos de cisteína o por uniones peptídicas con los residuos de lisina. La HCY también se une a lipoproteínas, incluyendo lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL) mediante uniones peptídicas (Olszewski y McCully,1993).

Además de ser un factor para desarrollar enfermedades vasculares en pacientes jóvenes, la HCY es capaz de producir daño celular cerebral, lo que representa un factor grave para los pacientes con homocistinuria (Upchurch y cols.,1996).

La HCY es rápidamente autooxidada cuando se agrega al plasma, formando disulfuros de HCY, y HCY-tiolactona. Durante la autooxidación de la HCY se generan especies reactivas del oxígeno (ROS), como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el anión hidroxilo, moléculas con la capacidad de producir daño endotelial, y por consiguiente, daño a la pared vascular, alterando la regulación vasomotora, cambio del fenotipo antitrombótico, activación de la agregación plaquetaria, activación de la elastasa, aumento de la deposición de calcio en la íntima arterial, así como la lipoperoxidación de las lipoproteínas plasmáticas (Lozcalzo,1996; Ueland,1993; Welch,1998). Existe evidencia de que

el daño vascular producido por la HCY *in vitro* es mediado por la generación de peróxido de hidrógeno (Wall, 1980; Starkebaum y Harlan, 1986).

Tyagi en 1998, demostró que el disulfuro de HCY induce la expresión de colágeno en células vasculares de músculo liso de humano (HVSMC), la cual fue bloqueada por glutatión y N-acetilcisteína. Al parecer, la HCY interactúa con HVSMC a través de un receptor de membrana. La unión de la HCY al receptor fue revertida mediante N-acetilcisteína reducida (Tyagi, 1998). Una mezcla oxidativa de los disulfuros induce un estado proliferativo en la pared de los vasos sanguíneos. Por otra parte, se demostró que la HCY promueve el crecimiento de células musculares lisas lo cual fue asociado a la expresión de ciclina y a la actividad de cinasa, sugiriendo que la HCY puede tener un papel activo en la señal de transducción (Tsai y cols., 1996).

En un estudio llevado a cabo en arterias braquiales de 10 sujetos con concentraciones bajas de vitamina B12, y en 10 controles, se encontró que los niveles de HCY eran más altos en los sujetos con deficiencia de vitaminas que en los controles y que éste está asociado con una alteración en la vasodilatación dependiente del endotelio (Bellamy y McDowell, 1997).

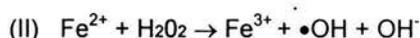
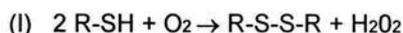
Aunque el mecanismo molecular preciso es desconocido, la HCY causa alteración endotelial a varios niveles. La HCY altera el fenotipo antitrombótico del endotelio, potenciando la actividad del factor XII y del factor V, y deprimiendo la activación del factor C. La HCY también inhibe la expresión de trombomodulina, induce la expresión del factor tisular y suprime la expresión de heparan sulfato por el endotelio. Todos estos efectos favorecen la formación de trombina y crean un ambiente protrombótico (Welch y Loscalzo, 1998).

1.4.1 HOMOCISTEÍNA Y RADICALES LIBRES

Un radical libre es definido como un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados. Estos pueden ser aniónicos, catiónicos o neutrales. En los sistemas biológicos, los radicales libres de mayor interés han sido los del

oxígeno. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son formadas en todos los organismos aeróbicos por reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las ROS, se incrementan tanto en procesos fisiológicos como en procesos patológicos, pero existen mecanismos eficientes que están involucrados en su detoxificación (Bergendi y cols, 1999).

Muchos autores han propuesto que los mecanismos moleculares por los cuales la HCY produce daño, pueden involucrar la producción de radicales libres. Las reacciones químicas por las cuales la HCY podría estar generando radicales libres han sido propuestas por Olszewski y McCully en 1993:



Un trabajo pionero sobre la citotoxicidad de la HCY en cultivo de células endoteliales demostró que la HCY sufre un proceso de oxidación a homocistina y que este evento puede ser revertido por la adición de catalasa, lo cual implica la participación de peróxido de hidrógeno, provocando daño celular endotelial, concluyendo que este daño es secundario a la generación de peróxido de hidrógeno (Starkebaum y Harlan, 1986).

Los grupos sulfhídrido de la HCY podrían actuar catalíticamente con iones férrico o cúprico, en un sistema de oxidación para generar peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, radicales homocisteinil, el radical anión homocistina, el anión radical disulfuro cisteína-Homocisteína y sus aniones radicales peroxisulfuros (Olszewski y McCully, 1993). Los radicales libres producidos por ésta u otras reacciones podrían causar daño patológico por muchos mecanismos, incluyendo toxicidad celular directa, peroxidación de lípidos y reacciones con óxido nítrico (Bellamy y McDowell, 1997, Olszewski y McCully, 1993).

La generación de peróxido de hidrógeno por la HCY puede tener un papel más importante en la inducción de daño celular, generando otras especies

reactivas al oxígeno (ROS). Se ha demostrado que el radical anión superóxido, un potente radical reactivo al oxígeno generado por la oxidación de la HCY, causa lipoperoxidación (Upchurch y cols.,1997). Además, el radical superóxido, en combinación con el óxido nítrico, forma el anión peroxinitrito, un potente oxidante (Upchurch y cols.,1997).

1.4.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

El estrés oxidativo se define como cualquier mecanismo, ya sea físico, químico, o infeccioso, por el cual se incrementa el potencial oxidativo en un sistema biológico o que disminuye la capacidad de sus defensas antioxidativas. Uno de estos mecanismos es la formación de radicales libres, los cuales son especies atómicas o moleculares extremadamente reactivas en virtud de que poseen electrones desapareados, confiriéndoles inestabilidad. Los radicales libres pueden causar reacciones adversas in vivo las cuales resultan en daño celular y en una alteración de la función con una subsecuente inflamación tisular y estado de enfermedad. Más aún, los radicales libres son comunes en sistemas biológicos, y, de hecho, son esenciales para el mantenimiento de la vida (Levine y Kid-Parris,1986; Bergendi y cols.,1999). Uno de estos sistemas biológicos son las membranas celulares, las cuales están formadas de fosfolípidos, que constan de una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica, constituidas por dos cadenas de ácidos grasos insaturados, es decir, que poseen dobles enlaces carbono-carbono. A la reacción oxidativa en cadena sobre la membrana lipídica se le conoce como peroxidación de lípidos (PL). La existencia de estos dobles enlaces carbono-carbono a nivel de los ácidos grasos insaturados facilita la descolocación del electrón libre, y por otra parte, la presencia de oxígeno molecular O_2 facilita el apareamiento de uno de sus electrones con el electrón libre desapareado, el cual potenciará el daño primario (Halliwell y Gutteridge,1985).

Los pasos intermedios en la reducción del oxígeno son la formación del anión

radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Tabla 2), correspondiendo a la reducción por uno, dos o tres electrones respectivamente. El peróxido de hidrógeno, que se forma *in vivo* mediante las enzimas específicas para su remoción, tal como la catalasa y glutatión peroxidasa, es probablemente más peligroso que el superóxido (Bergendi y cols., 1999).

Tabla 2. Vida media de los radicales libres (Bergendi y cols.,1999).

Intermediario	Fórmula	T/m (seg)
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-9}
Radical alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	10^{-6}
Singulete de oxígeno	$^1\text{O}_2$	10^{-5}
Anión peroxinitrito	ONOO^-	0.05-1.0
Óxido nítrico	$\cdot\text{NO}$	1-10
Radical semiquinona	—	Días
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Descomposición enzimática
Radical peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	7
Anión radical superóxido	O_2^-	Descomposición enzimática

1.5 LIPOPEROXIDACIÓN

Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas; ésto es, que contienen regiones hidrocarbonadas las cuales tienen poca afinidad por el agua, junto con partes polares que se asocian con el agua. En las membranas celulares de animales, los lípidos dominantes son fosfolípidos, los cuales están basados en el glicerol, pero en la superficie de algunas membranas existen proporciones

significativas de esfingolípidos y de colesterol que constituyen la parte hidrofóbica (Halliwell y Gutteridge, 1985).

La química básica de propagación de la reacción de lipoperoxidación es conocida desde hace muchos años, pero el mecanismo de iniciación de este proceso en un sistema de membranas biológicas es incierto. Actualmente, los ensayos disponibles para la medición de la lipoperoxidación son revisados, y los ensayos más específicos utilizan la menor cantidad de peróxido y están montados en tejidos humanos y fluidos biológicos. La lipoperoxidación puede aparecer como consecuencia del daño al tejido en algunas enfermedades y algunas veces puede contribuir a empeorar el tejido dañado (Gutteridge y Halliwell, 1990).

1.5.1. EL PROCESO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN

La elevada energía de irradiación de soluciones acuosas producto de radicales hidroxilo reactivos ($\cdot\text{OH}$), puede atacar moléculas biológicas, incluyendo membranas lipídicas. El ataque por el radical hidroxilo puede dar como resultado la iniciación de la lipoperoxidación.

Otros estudios de lipoperoxidación involucran la transición de iones metálicos, como fierro o cobre, y cualquier ion de los quelantes simples, los cuales se han detectado en sistemas lipídicos de donde se aíslan membranas biológicas como microsomas, mitocondrias, eritrocitos o membranas plasmáticas; en todos éstos sistemas puede ocurrir la lipoperoxidación. Las formas oxidadas de iones metálicos de transición como, Fe^{2+} y Cu^{2+} , puede acelerar la lipoperoxidación cuando se agrega un agente reductor que provoca la oxidación de estos iones. En algunos casos, las membranas pueden proporcionar reductos, por ejemplo los grupos sulfhídrico (SH) de las proteínas pueden reducir al cobre Cu^{2+} a Cu^{1+} , y el electrón es transportado a la cadena respiratoria, donde puede reducir al fierro Fe^{3+} -ADP a Fe^{2+} -ADP (Gutteridge y Halliwell, 1990).

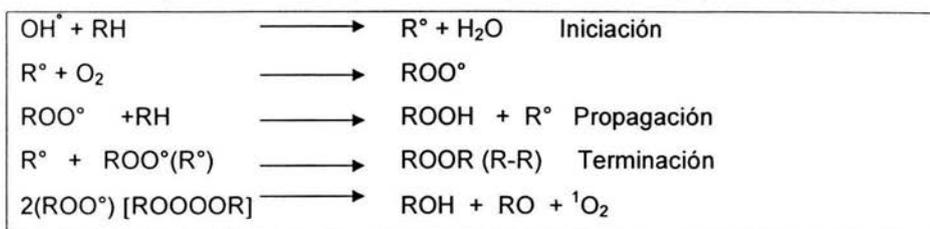
La iniciación de la secuencia de la lipoperoxidación en una membrana de ácidos grasos poliinsaturados es debida al ataque de cualquier especie que posee

suficiente reactividad para sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, así, el átomo de carbón queda con un electrón desapareado. El carbón radical, denominado peróxido ($R-OO\cdot$), tiende a estabilizarse mediante un reacomodo molecular para producir un dieno conjugado (Gutteridge y Halliwell, 1990).

El radical peróxido puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica, y a este proceso se le denomina propagación, de tal manera que una vez iniciado este proceso, tiende a continuar como una reacción en cadena. El radical peróxido se combina con el átomo de hidrógeno que fue sustraído para formar un hidroxiperóxido lipídico ($R-OOH$). Los hidroperóxidos son igualmente degradados, formando varios alcanos y aldehídos. Uno de los productos de degradación, el dialdehído malónico, puede reaccionar con los grupos tiol (SH) o aminos (NH_2) de las proteínas y formar compuestos fluorescentes (Gutteridge y Halliwell, 1990).

La reacción en cadena se detiene cuando dos radicales libres pertenecientes o no a la misma molécula, interactúan creando entre ellos dos puentes. Ésta es igualmente frenada por el encuentro con moléculas captadoras de radicales libres tales como el alfa tocoferol (Halliwell, Gutteridge 1985).

Cuadro 1. Representación esquemática del proceso de la lipoperoxidación



El ataque de radicales sobre los ácidos grasos insaturados y la lipoperoxidación en cadena son, en última instancia, el origen de una desorganización profunda de la estructura de la membrana, especialmente a expensas de los dobles enlaces carbono-carbono y los puentes intra e intermoleculares. La membrana celular pierde así su flexibilidad y solidez con el daño subsecuente en sus funciones de barrera e información (Gutteridge y Halliwell, 1990).

1.6. ANTIOXIDANTES

Se define como un antioxidante a cualquier sustancia que previene la oxidación de otro compuesto por algún oxidante (radical libre), por el cual, el mismo agente antioxidante es oxidado. Estas reacciones son frecuentemente en cadena, en las cuales, existe la formación de nuevos radicales libres; de hecho, nuevos radicales libres son formados en vez de ser eliminados. Desde el punto de vista biológico, un antioxidante es un compuesto, que, a bajas concentraciones, y después de reaccionar con un radical libre, es relativamente estable, ya sea en forma de un radical o no radical, y no dispara una reacción en cadena durante la cual otros nuevos radicales libres y sustratos oxidados puedan ser producidos. La acción antioxidante, en el amplio sentido de la palabra, resulta en la protección de importantes sustancias celulares y consecuentemente, en la protección del organismo completo contra el daño oxidativo producido por especies reactivas del oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1992).

Las enzimas superóxido dismutasas dependientes de Cu/Zn y Mn (SOD-Zn, Cu), son de las más importantes enzimas antioxidantes intracelulares. Son metaloenzimas relativamente estables que catalizan la dismutación de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La deficiencia de superóxido dismutasa (SOD) en el organismo resulta en un incremento en la sensibilidad a hiperoxia como se puede notar en los niños con una monosomía 21. Por otro lado, el incremento en la expresión de la SOD en el organismo, no puede ser siempre considerado como un efecto positivo. El peróxido de hidrógeno, producido por la vía catalítica de la SOD, puede tener funciones metabólicas negativas severas; por ejemplo, se ha observado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede favorecer la expresión de genes de virus causantes de la inmunodeficiencia humana en células infectadas (Bergendi y cols., 1999).

El glutatión (GSH) es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) que cumple una serie de funciones fisiológicas en el medio intracelular (Viña, 1986). Esta molécula posee dos características: la presencia de un enlace gama-glutamilo y un grupo tiol libre (-SH). El primer enlace impide que el GSH sea hidrolizado por las α -

peptidasas. Mientras que el segundo hace que el GSH sea extraordinariamente reactivo con otras sustancias, tóxicas o no. Se denomina sistema GSH al conjunto formado por éste y a las demás enzimas relacionadas con su metabolismo, responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister, 1988).

Otro grupo importante de antioxidantes es el de las selenoproteínas, de las cuales 4 son glutatión peroxidasa (GSH-Px). Estas son enzimas intracelulares formadas por 4 subunidades y cada una de ellas contiene selenio(Se), que es esencial para su actividad catalítica. Estas enzimas metabolizan al H_2O_2 y a los lipoperóxidos en diferentes compartimentos de la célula. La primera selenoproteína en ser caracterizada en mamíferos fue la GPx citosólica; la pérdida de la función de ésta enzima tiene como consecuencia un incremento en la producción de ROS con el subsecuente daño a los ácidos grasos insaturados en membranas y proteínas de la célula. Los ácidos grasos poli insaturados son muy susceptibles a la peroxidación, a nivel de sus dobles ligaduras (sus zonas más débiles). En la lipoperoxidación, además de los hidroperóxidos, se forman dos especies excitadas, el carbonilo excitado y el 1O_2 singulete, que cuando van perdiendo su excitación producen luminiscencia (quimio-luminiscencia), que se puede cuantificar y se usa para medir el estado del balance oxidación/antioxidación (De Rosa, 1998).

1.6.1 N-ACETIL-L-CISTEINA. (NAC)

La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un antioxidante y precursor de la síntesis del glutatión, donando grupos SH; además actúa directamente con los radicales OH, disminuyendo los efectos tóxicos de éstos (Aydin y cols., 2002). La presencia de grupos SH parece ser fundamental en la vasodilatación inducida por nitratos y la NAC potencializa hemodinámicamente ésta respuesta a nitratos (Boesgaard y cols., 1991). Además, NAC interfiere con grupos SH de otros compuestos

formando con ellos mezclas disulfuro, ayudando a una eliminación más eficiente del organismo, y representando una alternativa para el tratamiento de pacientes hiperhomocisteinémicos (Ventura y cols., 1999). Estos efectos parecen ser dependientes de la dosis, siendo más marcados en sujetos tratados con dosis más altas (Ventura,2003). También se ha demostrado que NAC inhibe al factor NF-Kappa B (Carroll, 1998), al metabolismo de fosfolípidos, a la liberación de citocinas proinflamatorias y a la actividad de proteasas en membranas fetales humanas (Lappas y cols. ,2003). En modelos animales de enfermedad isquémica cerebrovascular experimental, la administración de NAC intraperitonealmente protege al cerebro de daño contra la producción de radicales libres, apoptosis e inflamación (Khan y cols., 2004), además de inhibio la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (α -TNF) y de la óxido nítrico sintasa (ONS) (Sekhon y cols., 2003). En células piramidales que han sufrido un evento de anoxia/hipoglicemia, se ha demostrado que la inhibición en la síntesis de proteínas, provoca la activación de los receptores tipo NMDA (N-metil de aspartato), y esta inhibición en la síntesis de proteínas es bloqueada por la NAC (Monje y cols., 2000).

1.7. RECEPTORES TIPO NMDA

Los receptores para aminoácidos excitadores son generalmente reconocidos como los principales receptores para neurotransmisores que modulan la excitación sináptica en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados. Las primeras evidencias acerca de aminoácidos como neurotransmisores se generaron a mediados del siglo pasado y fueron apoyadas por experimentos en los cuales la aplicación tópica del glutamato monosódico (Glu) a la corteza motora provocó convulsiones tónicas (Gasic y Hollman,1992). Posteriormente, experimentos en médula espinal y neuronas del SNC evidenciaron una acción directa despolarizante del Glu y del L-aspartato (Gasic y Hollman,1992).

El Glu activa a tres grandes familias de receptores ionotrópicos y a una familia de receptores metabotrópicos, caracterizados por su sensibilidad hacia sus

agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato, α -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxalol-4-propionato (AMPA) , y 1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato. Todos los subtipos de receptores de Glu de algún modo han sido implicados en neurotoxicidad (Wood y Bristow,1998).

Además, se ha demostrado que el complejo del canal receptor NMDA contiene: (1) un sitio de reconocimiento para glutamato/NMDA, para el cual los análogos de fosfonato como el ácido amino fosfonovalérico y el ácido amino fosfonoheptanoico son antagonistas competitivos, (2) un sitio regulador de glicina,(3) un sitio modulador para poliaminas y zinc, (4) un sitio de unión a Mg^{2+} dependiente de voltaje, y (5) un segundo intracanal en el cual la fenciclidina, el MK-801, y análogos relacionados sirven como antagonistas no competitivos (Coyle y cols.,1991).

Los receptores tipo NMDA juegan un papel importante en la potenciación a largo plazo (LTP) en la región CA1 del hipocampo y en algunos tipos de aprendizaje, especialmente en aquellos relacionados a la orientación espacial de un animal en su medio ambiente (Gasic y Hollman,1992). También se ha reportado que la activación de receptores NMDA resulta en un incremento en la síntesis de óxido nítrico mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Garthwaite y Halliwell,1989), por lo que una inhibición de la SON resulta en una potenciación de la toxicidad mediada por los receptores tipo NMDA (Connop y cols.,1995).

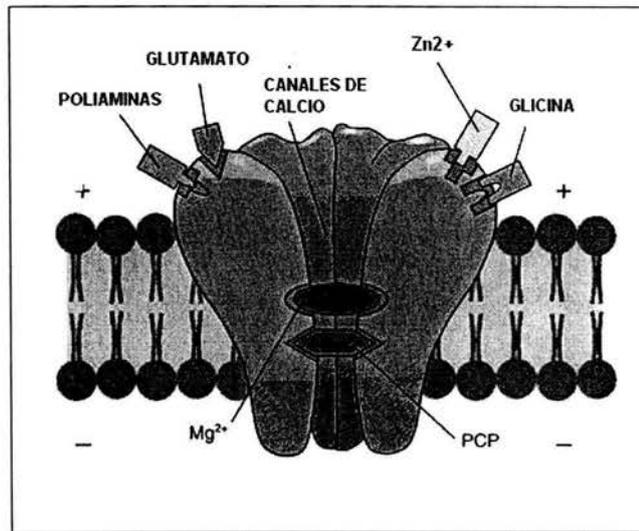
El término "excitotoxicidad", se refiere a la muerte neuronal causada por la sobre-estimulación de receptores a aminoácidos excitadores. Se ha reportado que el glutamato y el NMDA, pueden inducir la generación de radicales libres derivados del oxígeno, como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), sugiriendo que la formación de estas especies constituye un mecanismo vinculado al daño excitotóxico en el cerebro (Lancelot y cols.,1998).

Otro mediador de la neurotoxicidad del glutamato es el ON, el cual se forma en el cerebro a partir de la L-arginina, de una óxido nítrico sintasa citosólica

dependiente de calcio y NADPH, y que reacciona fácilmente con el $O_2^{\cdot -}$ para formar el oxidante peroxinitrito ($ONOO^-$) (Lancelot, 1998).

Por otra parte, la SON puede estar involucrada en la síntesis de radicales libres en condiciones excitotóxicas. Se ha demostrado que la SON puede generar $O_2^{\cdot -}$ en neuronas carentes de L-arginina y que están expuestas a NMDA, y así contribuir a la generación del radical OH^{\cdot} (Lancelot, 1998).

Fig. 3. Representación esquemática de un receptor NMDA, y sus sitios de unión



1.7.1. HOMOCISTEÍNA Y EXCITOTOXICIDAD.

Se ha demostrado que la administración sistémica de HCY a animales de experimentación produce crisis tónico-clónicas generalizadas (Hammond y cols., 1980; Folbergrová, 1974). Al igual que otros aminoácidos que contienen un grupo tiol y que están relacionados estructural y metabólicamente, la HCY produce

crisis epilépticas (Meldrum y Gorthwarte,1990). Estudios realizados en células granulares de cerebelo han demostrado que la HCY produce radicales libres y citotoxicidad. Esto fue comprobado mediante la incubación de estas células en presencia de superóxido dismutasa y catalasa, midiendo la producción de lactato deshidrogenasa como un índice de daño celular, observándose una disminución en la liberación de lactato deshidrogenasa inducido por la superoxido dismutasa o la catalasa (Won-Ki y Young-Sook,1996).

Adicionalmente, en estudios realizados en cultivos de neuronas corticales, se demostró que la HCY produce neurotoxicidad, a través de un incremento en el calcio intracelular mediante la activación de receptores NMDA, pero no de receptores no-NMDA. Esto también ha sido observado con otros compuestos relacionados metabólicamente con la HCY, como es el ácido homocisteico y la cisteína (Olney y cols.,1990; Won-Ki y Young-Sook ,1996).

Recientemente se probó que la HCY tiene la capacidad de actuar como un agonista en el sitio del glutamato del receptor para NMDA, por lo cual ha sido clasificada como una excitotoxina potencial. Sin embargo, también se ha encontrado que la HCY actúa como un antagonista parcial del mismo receptor, lo que le confiere una acción doble sobre los receptores NMDA (Lipton y cols.,1997).

1.7.2.DIZOLCIPINA (MK-801)

La dizolcipina es un antagonista no competitivo para el receptor NMDA que se une al sitio de reconocimiento de la fenciclidina en el canal del receptor (Wong, 1996). Estudios con MK-801 han demostrado que produce una mejora en el efecto funcional y en la morfología histológica en el trauma cerebral y daño en espina dorsal producido experimentalmente (Haghighi y cols.,1996; Rienert y Bullock, 1999), inhibe completamente la lipoperoxidación inducida por el ácido quinolínico (QUIN) en ratas pretratadas con este fármaco (Santamaría y Ríos, 1993), y la atenuación de la neurotoxicidad producida por la metafentamina en terminales dopaminérgicas de estriado (Weihmuller y cols., 1992). El uso clínico del MK-801,

ha sido descartado a causa de los efectos colaterales, tales como cataflexia, alteraciones locomotoras, alteraciones en el electroencefalograma, hipotensión, y una depresión de los niveles de la conciencia dependiente de la dosis (Muir y Lees, 1995).

1.8. ÓXIDO NÍTRICO

Durante la década de los ochenta, ocurrió un importante descubrimiento en el campo de la biología; se encontró que uno de los compuestos más simples, el óxido nítrico (ON), se encuentra produciéndose continuamente en el hombre y en los animales, actuando como un regulador universal del metabolismo. El ON es una importante molécula que actúa en diferentes tejidos para regular diversos rangos de procesos fisiológicos. Inicialmente fue descubierto por muchos grupos como el agente responsable de la relajación de los vasos sanguíneos, el cual fue denominado como factor relajante derivado del endotelio (EDRF), y se creyó que era una proteína como otras muchas moléculas de señalización (Moncada y cols., 1991; Bredt y Snyder, 1990).

El ON, es una molécula pequeña, capaz de difundirse rápidamente a través de las membranas celulares, y dependiendo de las condiciones imperantes, es capaz de difundirse a distancias de muchos cientos de micras, con una vida media de 1 a 5 segundos (Upchurch y cols., 1996).

El ON es moderadamente soluble en el agua, con una concentración en una solución saturada (1 atmósfera) de 1.8 mM a 25°C, siendo mucho más soluble en solventes no polares, como el N-hexano, disolviéndose de manera selectiva en las membranas y en las fases lipídicas de las células por ser altamente lipofílico. Utilizando microsensores no selectivos para el ON, se han demostrado altas concentraciones de éste en zonas adyacentes a la membrana plasmática de una célula endotelial productora de ON. En una membrana celular, el ON puede

difundirse bidireccionalmente, usando a la membrana en ocasiones como reservorio, aunque el volumen total de la fase acuosa para el ON es bastante mayor que el volumen de la bicapa de la membrana. La constante de difusión del ON en agua es generalmente de $2.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, valor que se incrementa considerablemente con la temperatura (Rodrigo y cols.,1999).

La regulación biosintética es más importante para el ON que para otros neurotransmisores, debido a que el ON no puede ser almacenado, liberado o inactivado después de la liberación postsináptica por mecanismos regulatorios convencionales (Bredt y Snyder,1994).

El ON es sintetizado a partir de la oxidación de la L-arginina en el grupo guanidino en un proceso que consume 5 electrones; esta reacción es catalizada por la enzima ON sintasa (ONS) resultando en la formación estequiométrica de ON y L-citrulina. Dicha enzima es dependiente de NADPH y Ca^{2+} , con la subsecuente activación de la guanilato ciclasa (Bredt y Snyder,1989; Knowles y cols,1989).

El ON esta implicado en un gran número de procesos fisiológicos, como son la relajación muscular, la inhibición de la agregación plaquetaria, la regulación inmune, la apoptosis, y la neurotransmisión. La química del ON involucra un arreglo de diferentes formas redox: El catión nitroso (ON^+) que es la forma oxidada, el radical libre o forma neutra llamado óxido nítrico (ON^\cdot) y el anión nitroxilo que es la forma reducida (ON^-). Las propiedades químicas de estas especies moleculares son dadas únicamente por la adición o ausencia de un electrón (Stamler y cols.,1992).

El papel que juega el ON dentro del proceso de daño cerebral isquémico ha sido muy debatido. Parte del problema han sido las características biológicas del ON que sugieren que puede ser benéfico o dañino para la función cerebral. Por un lado, el ON es un potente vasodilatador y un inhibidor de la agregación plaquetaria y adhesión leucocitaria, pudiendo también inhibir el flujo de calcio a través de los receptores de NMDA y limitando así, la neurotoxicidad del glutamato en isquemia cerebral (Iadecola,1997).

El papel de mensajero del ON, fue descrito por primera vez en células granulares

cerebrales expuestas a glutamato y donde se observó una liberación de ON. Se demostró, que la activación dependiente de calcio de la guanilato ciclasa, seguida de la unión de glutamato en los receptores NMDA, procede mediante la vía de generación de ON endógeno (Garthwaite y cols.,1988).

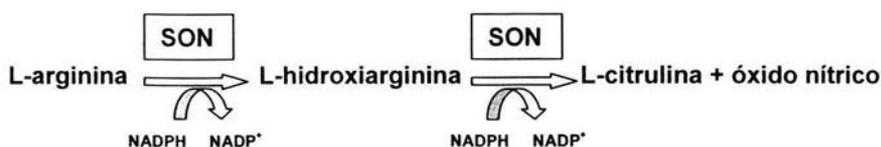
En un reporte, con importantes implicaciones para el entendimiento de la neurotoxicidad del glutamato, se describió el bloqueo de la neurotoxicidad del glutamato, mediada por receptores tipo NMDA en cultivos corticales primarios, por inhibidores de la ONS (Snyder y Bredt, 1991).

1.8.1 SINTESIS DEL OXIDO NITRICO

El ON es sintetizado por un grupo de enzimas llamadas Óxido Nítrico Sintetasas (ONS's). Estas enzimas convierten a la arginina en citrulina, produciendo ON en el proceso (Fig.4). Muchos tejidos y células expresan una o más isoformas de ONS. A la fecha existen tres isoformas distintas de ONS denominadas de acuerdo a su actividad o tipo de tejido en el cual fueron descubiertas. Las isoformas de las ONS son: Neuronal (nSON) (también denominada SON I y originalmente presente en neuronas), la SON inducible (iSON) (también denominada SON II y expresada en macrófagos murinos), y la SON endotelial (eSON) (denominada como SON III, una forma distinta de isoforma constitutiva localizada en el endotelio) (Boje y Arora,1998). Las SON pueden ser diferenciadas por su regulación por calcio. En el cerebro, un estímulo excitatorio producido por el glutamato a nivel de receptores tipo NMDA, dispara una descarga de calcio, la cual se une a calmodulina activando a la SON. De este modo, la activación de SON explica la capacidad del glutamato para estimular la formación de ON en forma de segundo mensajero. En los vasos sanguíneos, la acetilcolina actúa a nivel de receptores muscarínicos sobre células endoteliales, activando el ciclo fosfoinosítidil para generar calcio, el cual estimula a la SON. Existen

cantidades de SON reguladas por calcio involucradas en la producción de ON que participan en eventos rápidos como la neurotransmisión y la dilatación de vasos sanguíneos (Bredt y Snyder,1994). Dos de estas enzimas, la endotelial y la neuronal, se expresan constitutivamente en células de mamíferos en respuesta a un incremento intracelular de calcio. Sin embargo, ellas son capaces de sintetizar ON independientemente de los niveles de calcio en respuesta a un estímulo tal como el estrés. Por su parte, la actividad de la iSON en macrófagos y otras células no es estimulada por calcio ni bloqueada por antagonistas de la calmodulina; sin embargo, sorpresivamente, la iNON posee sitios de reconocimiento para la calmodulina. El aumento en los niveles de calcio lleva a un incremento de calmodulina. El incremento de unión de la calmodulina y de las nSON y eSON lleva a un aumento en la producción de ON por estas enzimas. En contraste, la isoforma iONS es capaz de unirse fuertemente a la calmodulina aún a muy bajas concentraciones de calcio (Bredt y Snyder,1994)

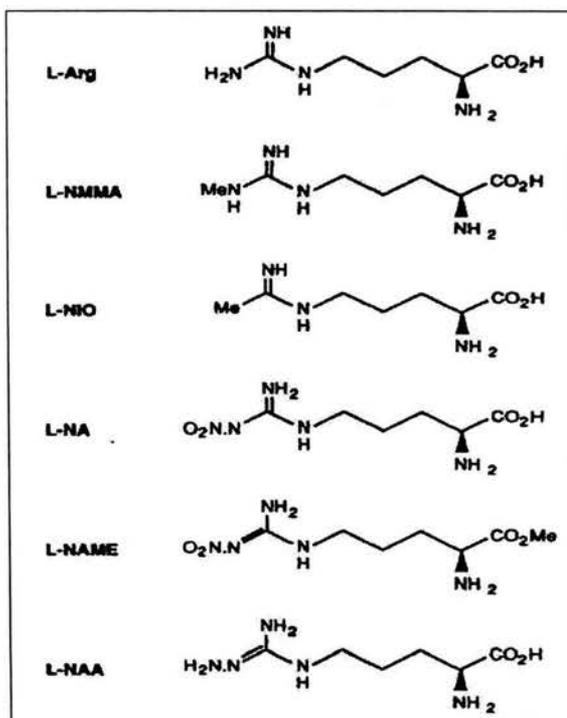
Figura 4. Síntesis del óxido nítrico y citrulina a partir de la L-arginina (Bredt y Snyder, 1994).



1.8.2. INHIBIDORES DE LA SON.

Como inhibidores de la SON se pueden señalar a los siguientes compuestos: a la $N\omega$ -monometil-L-arginina (L-NMMA), a la $N\omega$ -nitro-L-arginina (L-NA), a la $N\omega$ -metiléster nitro-L-arginina (L-NAME), a la $N\omega$ -amino L-arginina (L-NAA), y a la $N\omega$ -etilimino-L-ornitina (L-NIO) (Fig. 5). La L-NMMA, es un inhibidor competitivo e irreversible de las 3 isoformas de la SON, el cual, en condiciones fisiológicas, se encuentra en concentraciones bajas, pero en situaciones patológicas, pueden llegar a concentraciones elevadas que pueden disminuir la síntesis de ON. LNMMA, L-NIO, y L-NAME, son modificaciones de la L-arginina y tienen la capacidad de inhibir a la eSON (Moncada y cols., 1991).

Fig.5. Estructuras de la L-arginina y de sus inhibidores (Moncada y cols., 1991)



El desarrollo de un inhibidor selectivo de la ONS neuronal, el 7- nitroindazol (7-NI), ha permitido investigar la participación del ON liberado de las neuronas, al contrario de los inhibidores no selectivos derivados de la L-arginina. Se ha encontrado que el 7-NI es capaz de producir una neuroprotección significativa contra la excitotoxicidad mediada por el NMDA en estriado (Nanri y cols., 1998).

1.8.3.HOMOCISTEÍNA Y OXIDO NITRICO

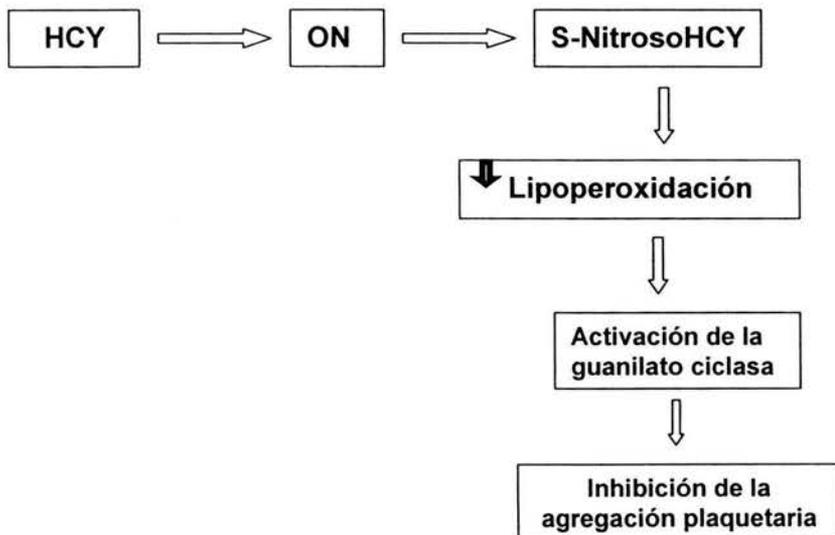
El mecanismo por el cual el daño endotelial es producido por la HCY se desconoce; sin embargo, la habilidad de la HCY para generar tanto peróxido de hidrógeno como HCY-tiolactona ha sido implicada como mecanismo potencial de daño mediante la generación de radicales libres, llevando a la alteración endotelial (Kang y cols,1986; McCully,1971).

Una importante reacción de la homocisteína es la formación de tionitritos o S-nitrosotioles (S-NT) al reaccionar con el óxido nítrico (ON) (Upchurch y cols.,1996).

El efecto de la hiperhomocisteinemia sobre la producción de ON es un ejemplo del potencial tóxico de ciertos tioles y la capacidad del ON para reducir su toxicidad mediante la formación de S-NT. Esta reacción se lleva a cabo bajo condiciones biológicas, de tal manera que estos compuestos son biológicamente activos, presentando propiedades similares a las del ON (Stamler y cols.,1992). La S-nitrosohomocisteína es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. Esta acción protectora del ON es, sin embargo, superada por la exposición crónica de las células endoteliales a la HCY (Loscalzo,1996). La nitrosación del grupo sulfhídrido de la HCY inhibe la generación de peróxido de hidrógeno generado por la HCY (Welch,1986). Se ha demostrado que los efectos adversos de la HCY son disminuidos por la formación del compuesto S-nitroso-

HCY, evitando así la formación de peróxido de hidrógeno y la conversión a HCY-tiolactona (Upchurch y cols.,1997) (Fig. 6). Todo esto podría explicar la arteroesclerosis producida por la HCY, sin embargo, existe una asociación más fuerte entre HCY y la enfermedad cerebro vascular que entre HCY y la enfermedad coronaria o enfermedad vascular periférica, por lo que las teorías sobre la generación de la arteroesclerosis no explican esta predilección, ni porque algunos pacientes con homocistinuria presentan deficiencias cognitivas (Lipton y cols.,1997). Se ha sugerido que la HCY causa una neurotoxicidad directa, mediante la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, y se sabe que la estimulación de estos receptores participan en el daño producido en isquemia focal, así que la HCY podría no sólo estar asociada con el daño vascular produciendo un evento cerebro vascular, sino que además podría participar en la respuesta neurotóxica en el cerebro (Lipton y cols., 1997)

Fig.6. Interacción de la HCY y el ON, para la formación de la S-nitroso HCY



1.8.4.HOMOCISTEÍNA, ÓXIDO NITRICO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL.

Las funciones del endotelio y del músculo liso están íntimamente relacionadas en muchos aspectos, incluyendo el control del tono vascular y flujo sanguíneo.

El ON en el sistema vascular es un potente vasodilatador e inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria, afectando su acción a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble, y llevando a un incremento del GMPc (Murad, 1979).

Una reacción importante del ON en condiciones fisiológicas es la formación de tionitritos o S-nitrosotioles. Estos complejos sirven como estabilizadores del ON permitiéndole ser almacenado, además de conservar sus propiedades como un potente vasodilatador. La hiperhomocisteinemia es un claro ejemplo de la toxicidad de ciertos tioles y la capacidad del ON para reducirla. Stamler, en 1993, demostró que los efectos vasculares adversos de la HCY, son mitigados por la formación de S-nitroso-HCY y que no existe la generación de peróxido de hidrógeno ni la formación de HCY-tiolactona (Fig 4), mecanismos que han sido implicados en la patogénesis de la HCY. Por ello, se sugiere que el daño endotelial es una consecuencia de la incapacidad de la célula para sostener la producción de ON en presencia de elevadas concentraciones de HCY (Upchurch, 1996), y el daño endotelial se genera durante la auto-oxidación de la HCY, generando especies reactivas al oxígeno tales como el superóxido, el cual reacciona con el ON para formar peroxinitrito, un potente agente oxidante (Loscalzo, 1996).

El ON, al liberarse del endotelio en respuesta al flujo de contracciones que se producen en las células de relajación del músculo liso a través del GMP cíclico, modula la densidad arterial, y al combinarse con una parte del tiol del S-nitrosotiol, puede actuar como un potente vasodilatador y antiplaquetario. Efectos adversos de la HCY pueden ocurrir cuando el endotelio es incapaz de soportar la producción de S-nitrosotioles debido al daño vascular. Por ello, en estas condiciones, la HCY puede generar peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y sufrir

conversión a HCY-tiolactona lo que puede contribuir más a la disfunción endotelial (Bellamy, 1997).

Además, se ha demostrado que las células endoteliales normales se destoxifican de la HCY, liberando ON y formando S-nitroso-HCY. La primera respuesta de las células cuando son expuestas a HCY es un incremento en la formación de S-nitrosotioles, incluyendo S-nitroso-HCY. Como resultado de estas observaciones, se ha propuesto que los efectos dañinos de la HCY sobre el endotelio son una consecuencia de la incapacidad de la célula para sostener una adecuada elaboración de ON en la presencia de concentraciones elevadas de HCY *in vivo* en pacientes con hiperhomocisteinemia (Stamler y cols, 1993).

El ON se ha implicado en mecanismos citotóxicos e independientes de GMPc, tales como la formación de radicales libres, nitrosilación de ácidos nucleicos, roturas del DNA e inactivación de enzimas con centros ferrosulfurados que alterarían los procesos energéticos celulares (Gross, 1995). En estos procesos, el efecto neurotóxico del ON es la formación de peroxinitrito como consecuencia su interacción con el anión superóxido. El peroxinitrito puede nitrar directamente o a través de otras especies reactivas del nitrógeno, los residuos de tirosina en proteínas, lo cual impide las interacciones funcionales de estos residuos y pone en peligro la viabilidad celular (Beckman, 1996).

Se ha demostrado que en los procesos hipóxicos-isquémicos existe la liberación de aminoácidos excitadores, particularmente la liberación de glutamato que actúa sobre los receptores NMDA, provocando un aumento de Ca^{2+} en las células diana (Olney y cols, 1991; Kiedrowski y cols., 1992). La activación de los receptores NMDA con la subsiguiente entrada de Ca^{2+} , provoca la activación de la ONS y la formación excesiva de ON y éste podría ser el responsable de la neurotoxicidad (Martín y cols., 1998).

2. HIPÓTESIS

Dada la conocida citotoxicidad ejercida por la HCY a través de mecanismos excitotóxicos en el SNC que, a su vez, son capaces de generar eventos de daño oxidativo, se propone que la HCY incrementará la peroxidación lipídica en fracciones sinaptosomales de cerebro de rata a través de la sobre-estimulación de receptores para NMDA y que su correspondiente bloqueo resultará en una inhibición del daño oxidativo. Consecuentemente, dado que la HCY tiene una mayor afinidad para activar a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA que para reaccionar con el ON inicial o para producir ROS al autooxidarse, entonces, en el daño producido por la HCY, participarán el ON y la formación de ROS como eventos posteriores a la activación de estos receptores. Por lo tanto, la inhibición de las sintasas del óxido nítrico y el empleo de antioxidantes resultará en la disminución de la lipoperoxidación en los sinaptosomas expuestos a la HCY. Finalmente, estos efectos también se reproducirán bajo condiciones *in vivo*, en donde se encontrará una correlación entre la lipoperoxidación regional en cerebro de rata y las crisis convulsivas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de los receptores para NMDA, el ON y los radicales libres en el patrón de toxicidad oxidativa evocado por la HCY, tanto *in vitro* como *in vivo* en el SNC.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar los cambios en la lipoperoxidación en sinaptosomas aislados de cerebro de rata, en una curva de concentración-respuesta a la Homocisteína
- 2.- Evaluar los niveles de lipoperoxidación a partir de la posible interacción de la HCY sobre los receptores NMDA en sinaptosomas aislados de cerebro de rata en presencia de un antagonista tipo NMDA (MK-801).
- 3.- Cuantificar los niveles de lipoperoxidación a partir de la posible interacción de la HCY y de diferentes inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME, L-NARG, 7-nitroindazol) y del antioxidante (N-acetil-cisteína).
- 4.- Comparar el poder pro-oxidante de la HCY con otros agentes excitotóxicos a concentraciones equimolares [glutamato (Glu), ácido kaínico (KA), ácido quinolínico (QUIN), ácido 3-nitropropiónico (3-NP)] y con el potente oxidante, sulfato ferroso.
- 5.- Medir el daño oxidativo producido por la HCY en diferentes regiones cerebrales de la rata en condiciones *in vivo*, cuando se administra sistémicamente y correlacionarlos con las diferentes crisis convulsivas que presente la rata.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. ANIMALES

Se emplearon ratas Wistar machos adultos (250-300 g de peso), las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los reactivos, equipos para análisis y la infraestructura disponible para la realización de algunos de los experimentos propuestos, fueron de igual manera proporcionados por el Instituto.

4.2. REACTIVOS

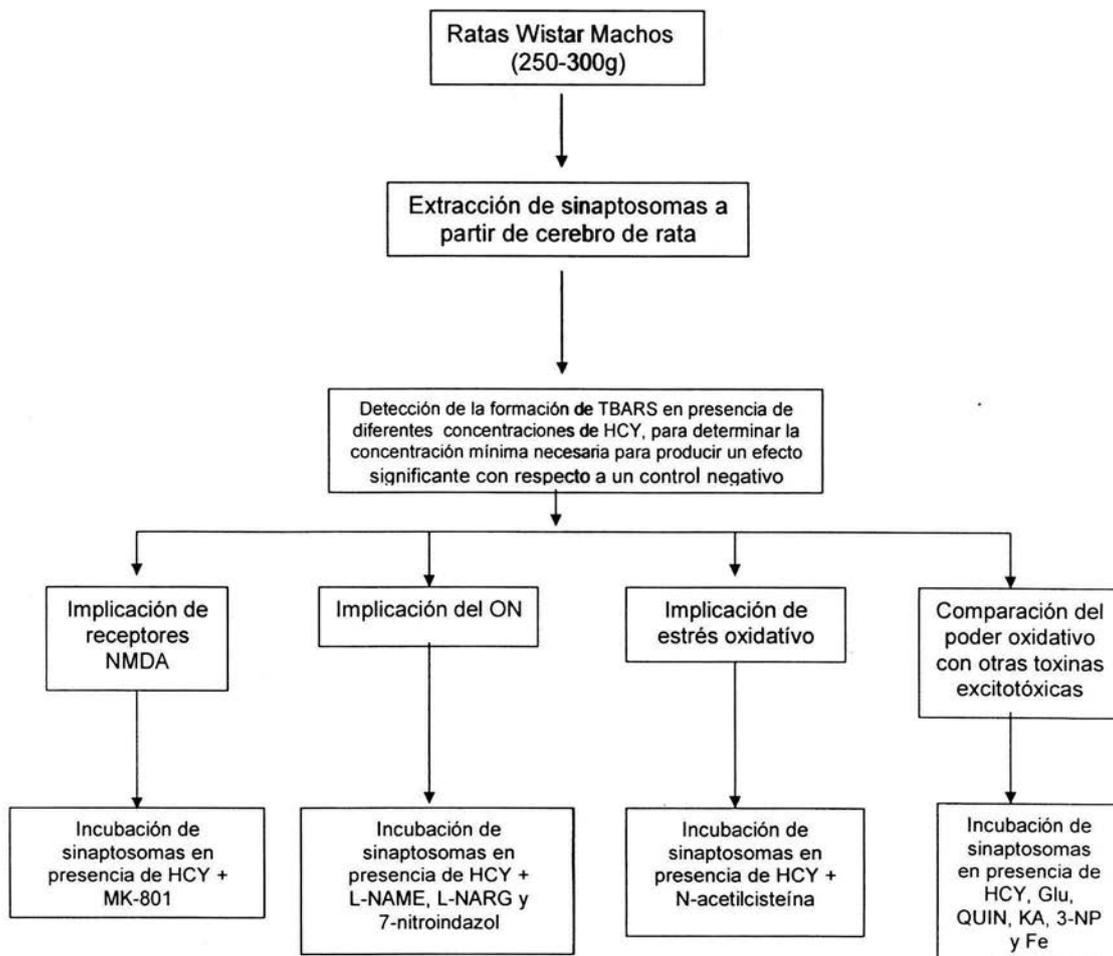
Cloruro de Calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, Hepes, solución fisiológica, ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, ácido clorhídrico, desferroxiamina, hidroxitolueno butilado, metanol, azul de Coomassie, ácido fosfórico, etanol, agua desionizada, MK-801, ácido 3-nitropropiónico, 7-nitroindazol, L-NARG, L-NAME, N-acetil-L-cisteína, glutamato, ácido, quinolínico, ácido kaínico, sulfato de hierro, DL-Homocisteína.

4.3. METODO *IN VITRO*.

El protocolo fue evaluado por el Comité Interno de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y se siguieron las normas internacionales para el manejo y el uso de animales de experimentación.

a) Desarrollo.

Se llevó a cabo la detección de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como un índice de lipoperoxidación "*in vitro*", de acuerdo a la técnica de Ríos y Santamaría (1991), en sinaptosomas de cerebro de rata durante una incubación previa a concentraciones crecientes de homocisteína, y en combinación con el antagonista no competitivo tipo NMDA (MK-801), de L-nitroarginina (L-NARG), L-nitroarginina-metil éster (L-NAME) y 7-nitroindazol (7-NI), conocidos inhibidores de la ONS., además del antioxidante N-acetilcisteína. Posteriormente, se agregó el ácido tiobarbitúrico, midiéndose las concentraciones de TBARS mediante espectofotometría a una longitud de onda de 532 nm, y realizando una curva estándar de oxidación periódica de 2-desoxi-D-ribosa (Fig. 7).

Fig. 7. Diagrama de flujo de la metodología *in vitro*.

4.3.1 AISLAMIENTO DE SINAPTOSOMAS

(Cotman and Matthews, 1971).

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, con un peso entre 250 a 300 g. Las ratas se decapitaron y se removió el cerebro, el cual fue homogenizado en una solución Ringer (pH=7.4) con Hepes (10 mM), ajustando el volumen en una proporción 1/20 p/v. Los homogenizados se centrifugaron a 4200r.p.m., durante 15 min. A 4°C. Se separó el sobrenadante, y se recolectó. Los botones se removieron y se centrifugaron de nuevo, este paso se repitió 2 veces más. Los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 20 min., y se resuspendieron los sedimentos en 5 ml de solución fisiológica.

4.3.2.TÉCNICA DE TBARS (determinación de lipoperoxidación)

(Santamaría et al., 2001)

En tubos de 1.5 ml se colocaron 250 µl de la suspensión con los sinaptosomas, posteriormente se adicionó la HCY a la concentración deseada (5-1000µM), se agitaron en vortex durante 30 segundos, y las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C.

Después de la incubación, se agregaron a cada muestra 500 µl del reactivo de TBARS, se agitaron nuevamente durante 30 segundos y posteriormente se agregaron 10 µl de desferroxiamina 1.5 mM y 10 µl de hidroxitolueno butilado al 0.375% p/v. Se incubaron las muestras a punto de ebullición en baño María durante 20 min. Se sacaron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 20 minutos, y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm de absorbancia.

4.3.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (Técnica de Bradford)

Curva estándar de albumina

Se preparó una solución estándar de albumina bovina a una concentración de 1 mg/ml, la cual sirvió para preparar una curva estándar, tomando diferentes alícuotas que van desde 0 hasta 25, llevar los volúmenes a 100 μ l con agua desionizada, posteriormente se agregaron 900 μ l del reactivo de Bradford a cada muestra, se agitaron durante 60 seg., y se dejaron reposar durante 15 minutos. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Cuantificación de las proteínas de los sinaptosomas

Para la cuantificación de las proteínas de los sinaptosomas, se tomaron 10 μ l del homogenado, se llevó a un volumen de 100 μ l con agua desionizada y se agregó 900 μ l del reactivo de Bradford. Se agitaron las muestras durante 60 segundos, se dejaron reposar durante 15 minutos, y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm.

Los resultados se interpolaron en una curva estándar de albumina.

4.4. MÉTODO *in vivo*.

Considerando que la HCY tiene la capacidad de generar diferentes patrones de crisis conductuales semejantes a las crisis epilépticas mediante procesos de excitabilidad en diferentes áreas cerebrales, se evaluó si los niveles de lipoperoxidación inducida por la HCY tenían una correlación directa con el patrón conductual en ratas tratadas con HCY. Para ello se emplearon ratas Wistar machos con un peso entre 250 y 300 gramos. Durante la segunda hora después de la administración de HCY se evaluó la conducta referente a los patrones de crisis convulsivas; posteriormente, los animales se sacrificaron por decapitación y

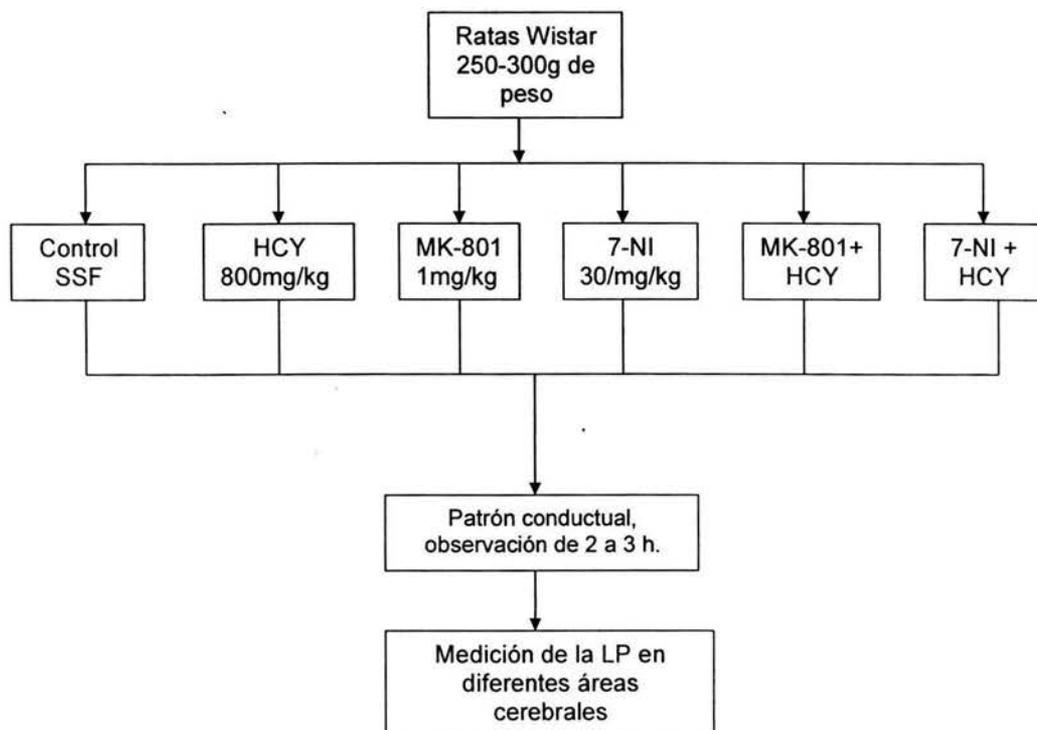
se evaluó la lipoperoxidación en diferentes áreas cerebrales, mediante la medición de los productos fluorescentes formados por la lipoperoxidación.

4.4.1.EVALUACIÓN CONDUCTUAL.

Al igual que el glutamato y el aspartato, otros aminoácidos (a.a.) excitadores que contienen grupos SH, tienen una participación importante en los procesos excitatorios del sistema nervioso central (SNC) (Allen,1986), actuando como agonistas de los receptores NMDA y que podrían interactuar con receptores metabotrópicos del glutamato (Folbergrová,1999). La administración de un fármaco de esta naturaleza, provoca diferentes patrones conductuales en animales de experimentación; las causas de estas diferencias no son claras, pero pueden sugerir que diferentes estructuras del cerebro y/o circuitos están probablemente activados, dependiendo de las rutas de administración (Folbergrová,1999).

Para correlacionar el patrón conductual y el daño oxidativo provocado por la administración sistémica de la HCY en ratas, así como de la participación del ON y de los receptores tipo NMDA, se diseñaron 6 grupos, a los cuales se les administraron los diferentes fármacos, y se observaron durante 2 a 3 horas: Grupo 1 control (solución salina fisiológica (SSF)); Grupo 2 (HCY 800mg/kg/peso (Folbergrova1994,1997; Hammond,1989)); Grupo 3 (MK-801, 1 mg/kg/peso); Grupo 4 (7-NI, 30 mg/kg/peso (Mackenzie,1995)); Grupo 5 (MK-801+ HCY); y Grupo 6 (7-NI+ HCY). Posteriormente, las ratas se sacrificaron por decapitación, y se diseccionaron 6 diferentes áreas del cerebro, se colocaron en nitrógeno líquido para posteriormente medir la lipoperoxidación a través de los productos fluorescentes (Ríos y Santamaría,1991) en 6 regiones del cerebro (corteza, estriado, hipocampo, hipotálamo, tallo y cerebelo) (Fig. 8).

Fig. 8. Diagrama de flujo, metodología *in vivo*.



4.4.2. ENSAYO DE PRODUCTOS LIPÍDICOS FLUORESCENTES.

(Ríos y Santamaría, 1991)

Las regiones cerebrales fueron homogenizadas en 1200 μ l de solución fisiológica. A 1 ml del homogenado, se le agregaron 4 ml de una mezcla de cloroformo-metano (2:1 v:v), Los tubos se taparon y se mezclaron en vortex durante 30 segundos, posteriormente se colocaron en hielo durante 30 minutos. Se separó la fase acuosa de la fase clorofórmica y se tomaron 1.8 ml de esta última fase, se mezclaron con 200 μ l de metanol y se leyeron en un espectrofotómetro de fluorescencia a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó con un solución estándar de quinina (0.1 μ g/ml) en una solución de ácido sulfúrico 0.05M. La concentración de productos lipídicos fluorescentes se expresó en unidades de fluorescencia por gramo de tejido fresco.

4.5. ANALISIS ESTADISTICO.

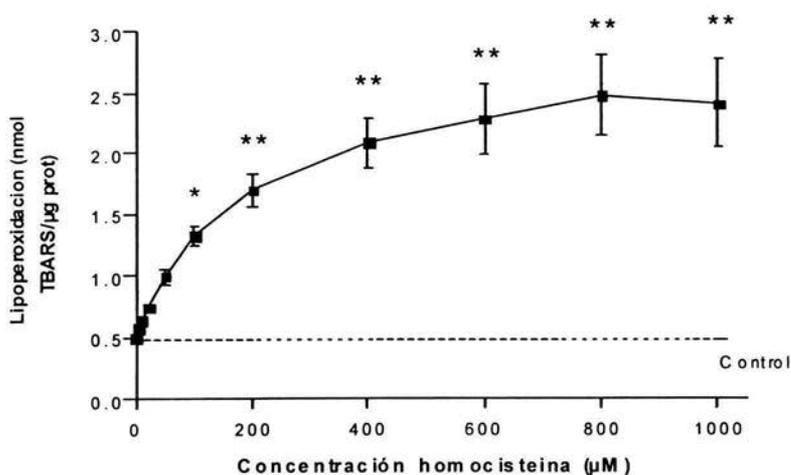
Para el análisis estadístico de todos los experimentos se empleó un análisis de varianza de una vía seguido de una prueba de Dunnet para comparación de grupos contra un control. En el caso de comparaciones entre dos grupos, se emplearon pruebas de t-student no pareadas.

5. RESULTADOS IN VITRO

5.1 CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA HOMOCISTEÍNA

Se llevaron a cabo incubaciones de sinaptosomas en presencia de concentraciones crecientes de HCY que fueron desde 5 μM hasta 1000 μM , encontrándose un incremento en la lipoperoxidación dependiente del aumento en la concentración de HCY (Fig 9). La lipoperoxidación se expresó en nmoles de TBARS formadas por mg de proteína, alcanzándose una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control a concentraciones de HCY entre 100 μM y 1000 μM (167% a 396% respectivamente comparado con el control), con una n=8. Dado que la concentración mínima de HCY para producir un efecto significativo sobre la lipoperoxidación fue de 100 μM , esta concentración fue utilizada para los siguientes ensayos.

Fig.9. Efecto de la lipoperoxidación inducida por la HCY en sinaptosomas de cerebro de rata.

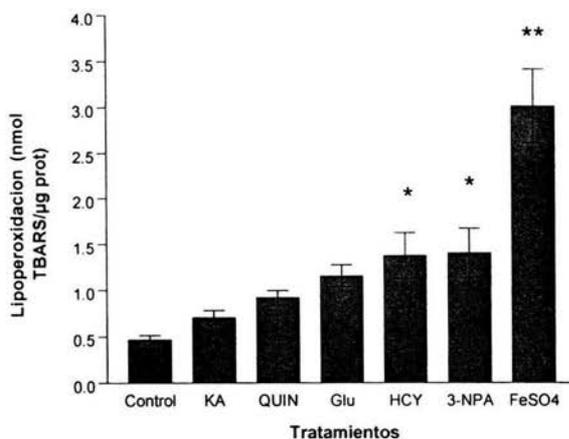


5.2 EFECTO COMPARATIVO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA HOMOCISTEÍNA CONTRA OTRAS TOXINAS.

Se realizó una comparación del potencial oxidativo de la HCY contra otras moléculas excitotóxicas a concentraciones equimolares (100 μ M) en sinaptosomas, como son: el ácido kainico (KA, un agonista glutamatérgico tipo no-NMDA); el ácido quínolinico (QUIN), un agonista glutamatérgico tipo NMDA; el glutamato (Glu), el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA una toxina mitocondrial); y un agente oxidante, como lo es el FeSO₄ (n=4).

La HCY mostró un mayor poder oxidativo que el KA y el QUIN (94% y 50%, respectivamente), similar a los presentados por el Glu y el 3-NPA (15% y -2% respectivamente), y menor que el evocado por el FeSO₄ (-54%) (Fig. 11).

Fig. 11. Comparación de la lipoperoxidación inducida por la HCY, con otros agentes excitotóxicos.

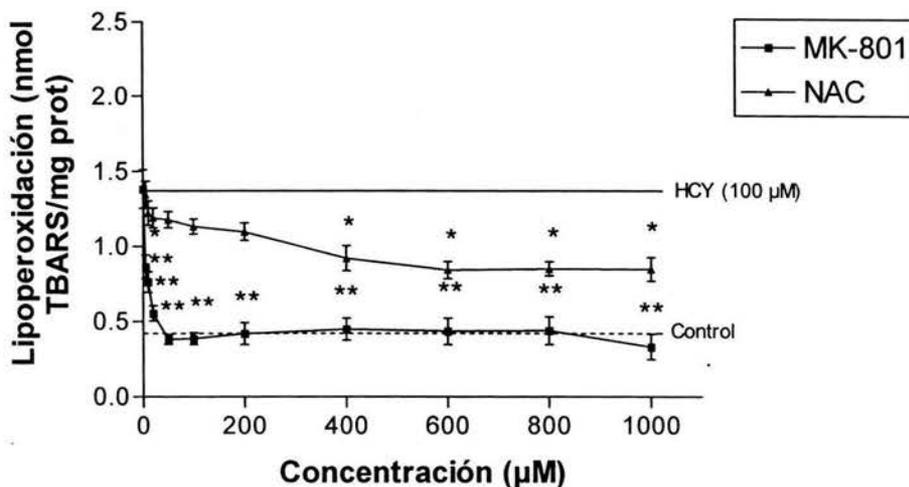


5.3 EFECTO DEL MK-801 Y DE LA N-ACETÍLCISTEINA, SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA HCY.

Para saber si la HCY ejerce su efecto peroxidante a través de la activación de receptores tipo NMDA, se llevaron a cabo coincubaciones de sinaptosomas en presencia de HCY a una concentración fija de $100\mu\text{M}$, y de concentraciones crecientes de MK-801 (entre $5\mu\text{M}$ a $1000\mu\text{M}$). Se observó, una disminución en la lipoperoxidación inducida por HCY inversamente proporcional al aumento en la concentración de MK-801 (línea n), alcanzándose valores similares a los basales desde concentraciones bajas de MK-801 (Fig.12). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo con HCY (línea continua), desde una concentración de MK-801 de $5\mu\text{M}$ y en adelante.

Por otra parte, para determinar la contribución directa de los radicales libres en la lipoperoxidación inducida por HCY, una serie adicional de sinaptosomas fue incubada en paralelo, conteniendo una concentración fija de HCY y concentraciones crecientes del conocido antioxidante, la N-acetil-L-cisteína. La línea con triángulos en la figura 12 muestra un efecto significativo de la L-NAC en la disminución de la lipoperoxidación de la HCY a concentraciones desde $400\mu\text{M}$ y hasta $1000\mu\text{M}$, aunque dicho efecto nunca fue tan pronunciado como el del MK-801.

Fig.12. Efecto del MK-801 y de la NAC sobre la lipoperoxidación inducida por la HCY.



5.4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA SON SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR HCY.

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del óxido nítrico sobre el daño inducido por la Homocisteína *in vitro*, para lo cual se realizaron incubaciones de los sinaptosomas en presencia de HCY (100 μM) y concentraciones crecientes de los inhibidores de la óxido nítrico sintasa (L-NARG, L-NAME, 7-NI), desde 5 μM hasta 1000 μM.

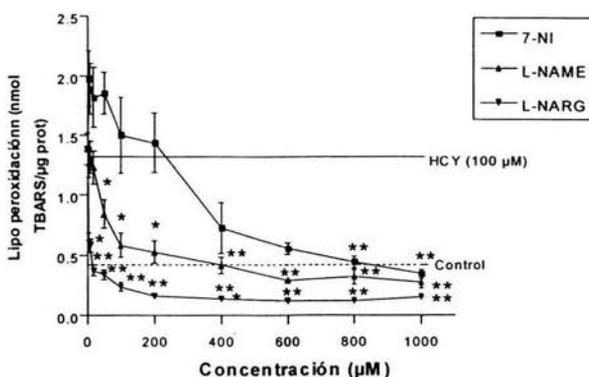
En la fig. 13 se muestra el efecto de la L-NARG sobre la lipoperoxidación, inducida por la HCY; se observa una disminución de la lipoperoxidación (-47%) a medida que se incrementa la concentración del inhibidor, encontrándose una diferencia significativa con respecto al control, desde una concentración de 20 μM, con una n=4 y una $p \leq 0.05$ (línea inferior ▼).

Por lo que respecta al efecto del L-NAME sobre la lipoperoxidación inducida por la HCY, se observa una disminución dependiente de la concentración de L-NAME (-51% a una concentración de 1000 μ M), encontrándose un efecto significativo desde una concentración de 50 μ M, con una n=6 y una $p \leq 0.05$ (línea central \blacktriangle)

De igual manera, el 7-nitroindazol, disminuyó la lipoperoxidación inducida por la HCY, pero obteniéndose una diferencia significativa con respecto al control desde una concentración 600 μ M, con una n=9 y una $p \leq 0.05$ (línea superior \blacksquare).

Consecuentemente, todos los inhibidores de la SON mostraron una disminución en la lipoperoxidación inducida por la HCY, aunque la L-NARG exhibió una mayor capacidad de inhibición, seguida por L-NAME, y finalmente 7-NI.

Fig. 13. Efecto de de los inhibidores de la SON (L-NAME, L-NARG y 7-NI), sobre la lipoperoxidacion inducida por la HCY



6. RESULTADOS IN VIVO.

Para estudiar la posible participación de los receptores tipo NMDA y del ON en el daño inducido por la HCY al ser administrado en forma sistémica en ratas, se diseñaron 6 grupos de ratas machos de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g. Se trató un grupo 15 ratas como controles a los cuales se les administró solución fisiológica intraperitonealmente. A un segundo grupo de 11 ratas se les administró HCY a una dosis de 800 mg/kg de peso corporal. Un tercer grupo de 6 ratas se administró con MK-801 a una dosis de 1 mg/kg de peso. Un cuarto grupo de 6 ratas se les administró 7-NI a una dosis de 30 mg/Kg de peso. Finalmente a 2 grupos más de 6 y 5 ratas se les administró la combinación de MK-801+HCY y 7-NI + HCY respectivamente, a las mismas dosis mencionadas anteriormente. Se observaron las ratas durante 2 horas después de la administración de los fármacos para ver el patrón de manifestaciones conductuales de los animales (tabla3) que incluyeron: CTCG= Crisis tónico clónico generalizadas, MMA= movimiento de miembros anteriores, MMP=movimiento de miembros posteriores, FASC= fasciculaciones, CH= carrera de huida, SPM= sacudidas de perro mojado; posteriormente se sacrificaron por decapitación y se diseccionaron 6 diferentes áreas cerebrales (tallo, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, corteza y estriado).

6.1. MANIFESTACIONES CONDUCTUALES EN LOS GRUPOS TRATADOS CON DIFERENTES FÁRMACOS.

De los diferentes grupos tratados, el de HCY presentó un mayor número de manifestaciones. El grupo tratado con MK-801 no presentó crisis conductuales; sin embargo, las ratas manifestaron caídas frecuentes y problemas al caminar (ataxia). El grupo tratado con 7-NI presentó algunas manifestaciones conductuales (a excepción de las CTCG, de la CH y del cabeceo) pero en un número mucho menor que el grupo tratado con HCY.

Por lo que respecta al grupo tratado con MK-801 + HCY, se observó un abatimiento de las manifestaciones conductuales con respecto al grupo tratado con HCY, presentándose mioclonias como única manifestación. Finalmente, el grupo tratado con 7-NI + HCY, mostró un abatimiento total en las manifestaciones conductuales con respecto al grupo con HCY (tabla 3).

Tabla 3. Manifestaciones conductuales que presentaron las ratas, administradas con HCY, MK-801 y 7-NI.

Tratamiento Tipo De crisis	Control n= 15	HCY n= 11	MK-801 n= 6	7-NI n= 6	MK-801 + HCY n= 6	7-NI + HCY n= 5
CTCG	—	10	—	—	—	—
MMA	—	33	—	1	—	—
MMP	—	2	—	2	—	—
FASC	—	25	—	9	—	—
CH	—	3	—	—	—	—
Cabeceo	—	53	—	—	—	—
SPM	—	16	—	1	—	—
Masticación	—	87	—	1	—	—
Mioclonias	—	78	—	1	5	—

HCY=800mg/kg de peso

MK-801= 1mg/kg de peso

7-NI= 30mg/kg de peso

6.2. TIEMPO DE LATENCIA A LAS CTCG EN EL GRUPO TRATADO CON HCY.

De las 11 ratas administradas con HCY, 7 presentaron CTCG. El tiempo de latencia para la presentación de estas crisis varió entre 56 y 96 minutos, con un promedio de 69.4 min. (tabla 4). Los tratamientos con coadministración de HCY más MK-801 y 7-NI, al no presentar crisis, no cuentan con un registro de tiempo de latencia

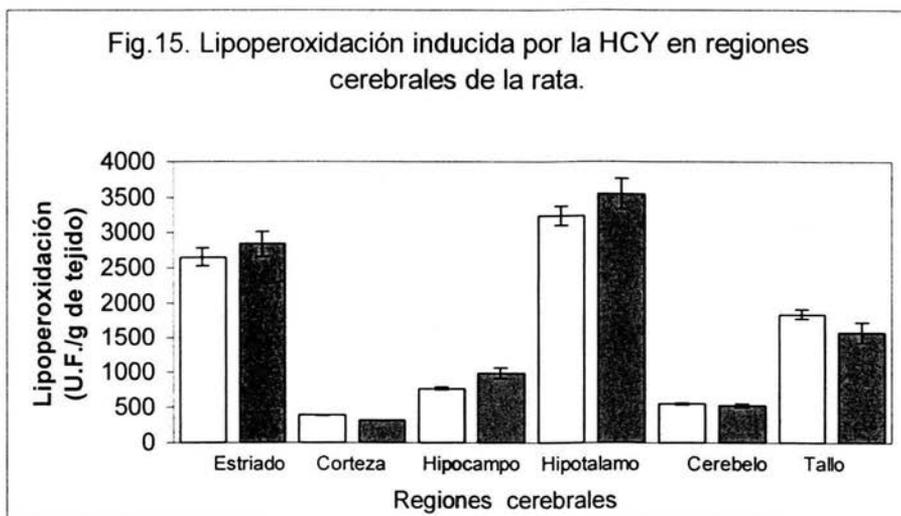
Tabla 4. Tiempo de latencia para CTCG para los animales administrados con HCY

RATA	HCY 800mg/kg/peso corporal
	Latencia CTCG (min.)
1	58
2	60
3	56
4	73
5	77
6	66
7	96
Promedio	69.4
DE	14.0
ES	5.3

6.3. LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA HCY EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE LA RATA.

Se realizó la medición de la lipoperoxidación en 6 regiones del cerebro de la rata (estriado, corteza, hipocampo, hipotálamo, cerebelo y tallo), para rastrear una correlación entre el tipo de crisis conductual que presenta la rata y el nivel de daño oxidativo generado por la HCY y la posible implicación de los receptores tipo NMDA y del ON.

Se realizó una prueba de t-student no pareada para comparaciones entre los grupos control (barras oscuras) versus tratamientos (barras claras) de las diferentes regiones, no encontrándose diferencias significativas en ninguna de la regiones



7. DISCUSIÓN

7.1. LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA HOMOCISTEÍNA.

El sistema nervioso es particularmente vulnerable a la acción de las ROS debido a su alto índice metabólico, por sus altos niveles de lípidos y la presencia de una gran variedad de prooxidantes (Delanty y Dichter, 1998). Así, ciertas áreas del cerebro son ricas en Fe y Cu, dos metales que tienen la capacidad de generar al altamente tóxico radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno o superóxido mediante la reacción de Fenton (Riederer y cols.,1989).

La HCY ha sido propuesta como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad vascular aterosclerótica (Motulsky,1996). El estrés oxidativo debido a la producción de ROS intracelular y extracelularmente, puede tener un papel importante en este tipo de enfermedades (Jacobsen, 2000). Debido a que la HCY y otros tioles poseen actividades pro-oxidantes, se ha postulado que el daño producido por la HCY es causado por la generación de estrés oxidativo sobre células vasculares y tejidos (Loscalzo, 1996; Jacobsen, 2000). El grupo SH de la HCY podría actuar catalíticamente con iones férricos o cúpricos para generar H_2O_2 , radicales hidroxilo y radicales homocisteinil (Bellamy y McDowell, 1997). Experimentos in vitro, sugieren que la HCY tiene la capacidad de generar aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y H_2O_2 , cuando ésta sufre autooxidación (Bellamy y McDowell, 1997).

Los resultados de este trabajo apoyan las evidencias del papel neurotóxico de la HCY a concentraciones más bajas que las reportadas por otros autores en células granulares (Won-Ki y Young-Sook, 1996), a través de la medición de peroxidación de lípidos como índice de estrés oxidativo en sinaptosomas extraídos de cerebro de rata e inhibiendo la lipoperoxidación utilizando al antioxidante N-metil-L-cisteína, encontrándose que la NAC disminuye parcialmente la LP inducida por la HCY de una manera concentración-dependiente.

7.2. HOMOCISTEÍNA Y EXCITOTOXICIDAD.

Una de las características de los pacientes con hiperhomocisteinemia es que la mayoría de ellos presentan retraso mental (Scriver, 1996). Además la administración de HCY en animales de experimentación les produce crisis tónico clónico generalizadas (Won-Ki y Young-Sook, 1996), lo que sugiere que la excitotoxicidad es un posible mecanismo de daño producido por la HCY. En estudios llevados a cabo en células granulares de cerebelo se ha reportado que la HCY induce muerte neuronal por activación de receptores tipo NMDA, así como la generación de RL (Won-Ki y Young-Sook, 1996); sin embargo, el mecanismo preciso por el cual la HCY produce daño no ha sido completamente dilucidado. Es este estudio, la lipoperoxidación inducida por la HCY, es completamente bloqueada por el MK-801, antagonista no competitivo del receptor NMDA (Santamaría y Ríos, 1993) a partir de concentraciones bajas, alcanzando valores basales de lipoperoxidación, sugiriendo que el daño producido por la HCY es más probablemente debido a eventos excitotóxicos relacionados a la activación de receptores tipo NMDA con la producción secundaria de radicales libres (Lipton y cols., 1997), lo cual está sugiriendo que el mecanismo de la lipoperoxidación ejercido por la HCY es estrictamente por la vía de la activación de receptores tipo NMDA, y que la inhibición parcial de la lipoperoxidación inducida por la HCY por la NAC, podría ser el resultado de la producción de RL después de la sobre activación de los receptores tipo NMDA. Se ha reportado que la estimulación de los receptores tipo NMDA induce la generación de RL, principalmente al anión superóxido y al radical hidroxilo, lo que sugiere que la producción de RL es uno de los mecanismos celulares responsables del daño excitotóxico en el cerebro (Lancelot y cols., 1998). La HCY es una molécula altamente citotóxica en células endoteliales en cultivo y este efecto puede ser inhibido con la adición de la catalasa, lo cual implicaría la formación de peróxido de hidrógeno por HCY (Starkebaum y Harlam, 1986). Adicionalmente, los hallazgos de la toxicidad de la HCY, tanto en células endoteliales como en células cerebrales, nos sugieren que

existe un mecanismo en común, que involucra la activación de los receptores tipo NMDA con la subsecuente producción de RL, apoyando la evidencia de la existencia de sitios de unión para NMDA en membranas de capilares cerebrales (Koenig, 1992). En resumen, la sobreactivación de los receptores tipo NMDA resulta en una cascada de eventos citotóxicos, empezando con la ruptura de la homeostasis de calcio y la producción de estrés oxidativo (Coyle y Puttfarrcken, 1993).

7.3. LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA HOMOCISTEÍNA E INHIBICIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.

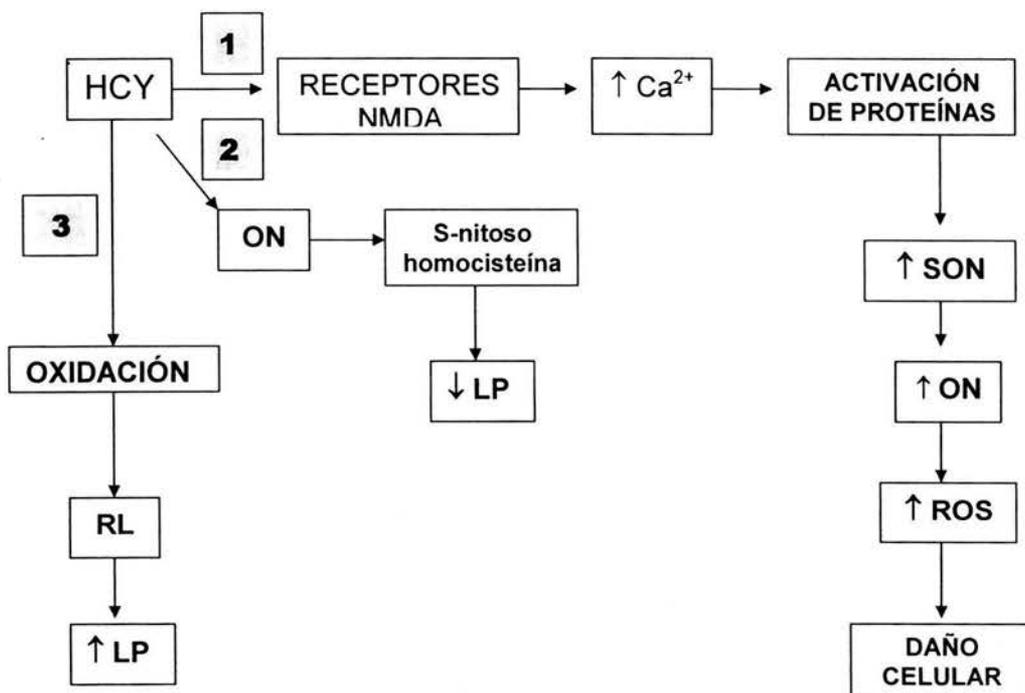
Los efectos del ON sobre la muerte neuronal involucran una serie de vías las cuales se interrelacionan para producir muerte neuronal. Dependiendo del proceso de la enfermedad y la secuencia temporal en la cual en ON esté involucrado, se ha reportado que puede tener un papel dual, ya que puede ser neuroprotector o neurotóxico, y que la inhibición de la SON y la remoción de L-arginina, precursor del ON pueden reducir la excitotoxicidad (Deckel, 2001).

Se ha sugerido que el ON atenúa la neurotoxicidad en cultivos primarios de neuronas corticales, mejorando las propiedades adversas de la HCY formando S-nitrosotioles (Kim, 1999), y evitando la formación de H_2O_2 , por lo cual se ha generado una hipótesis que sugiere que la toxicidad de la HCY es una consecuencia de la incapacidad de la célula de sostener una adecuada producción de ON en presencia de elevadas concentraciones de HCY (Upchurch y Welch, 1996). Se sabe que esta reacción se lleva a cabo bajo condiciones biológicas, así que estos compuestos son biológicamente activos, presentando propiedades similares a las del ON (Stamler y cols, 1993), permitiéndole aumentar su estabilidad y conservando todas las propiedades del ON en su forma libre (Upchurch, 1996). Sin embargo, nuestros resultados sugieren una situación contraria, ya que la inhibición de la SON en sinaptosomas extraídos de cerebro de rata por tres diferentes inhibidores resulta en una atenuación significativa de la

lipoperoxidación inducida por la HCY. En este contexto, se sabe que los S-nitrosotioles, tales como la S-nitrosocisteína y la S-nitroso-HCY, son capaces de producir neurotoxicidad, al sufrir ruptura homolítica y generar ON el cual reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito. Además, se ha demostrado que una concentración milimolar de tioles tiene una acción protectora en comparación con las concentraciones micromolares de S-NT, ya que estabiliza la formación de S-NT, evitando la formación de ON y la formación de peroxinitrito, y este efecto es debido al equilibrio entre tioles y S-NT (D'Emilia, 1999). Bajo las condiciones utilizadas en el presente estudio (concentraciones submilimolares de HCY en presencia de concentraciones subpatológicas de glicina (10 μM) suficientes para evocar la activación de los receptores tipo NMDA), la HCY puede seguir dos vías: 1) Las concentraciones micromolares de HCY podrían producir ON mediante la activación de los receptores tipo NMDA con la subsecuente activación de la SON mediada por Ca^{2+} /Calmodulina; éste ON reaccionaría con O_2^- para formar OONO^- . Esta reacción ha sido ampliamente descrita cuando ocurre una sobreactivación de receptores NMDA (Fig. 16) (Garthwaite, 1989); o 2) La HCY podría reaccionar con el ON generado de diferentes fuentes para eventualmente formar S-NT mediante la reacción de nitrosilación (Kim, 1999) a bajas concentraciones, lo cual, en ausencia de altas concentraciones de grupos tioles (D'Emilia, 1999), podría liberar ON para producir OONO^- y estrés oxidativo. Ambos mecanismos apoyan el papel protector de los inhibidores de la SON contra la LP inducida por la HCY. De hecho, estas consideraciones pueden servir para explicar el efecto protector de la NAC observada en este trabajo y tomarla como una tercera vía que puede tomar la HCY en el daño inducido por ésta (Fig.16), dado que la NAC representa una fuente de tioles (Pocernich, 2001), los cuales modularían el equilibrio tiol:nitrosotiol. Además, se ha reportado que el uso de inhibidores inespecíficos de la SON, tales como L-NARG y L-NAME, confiere un factor protector para reducir la neurotoxicidad y el estrés oxidativo inducido por una excitotoxina, el ácido quinolínico en diferentes preparaciones cerebrales de la rata (Santamaría, 1997; Santamaría, 1999; Pérez-Severiano, 1998). Por su parte el 7-NI, un inhibidor específico de la SON neuronal, que ha demostrado un efecto protector contra el

daño inducido por el MPP+ (O'Byrne, 2002), presentó el efecto menos potente contra la LP inducida por la HCY comparado con L-NARG y L-NAME en este estudio, lo que sugiere que ambas formas de SON participan en el control de los niveles de ON y del daño oxidativo inducido por la HCY.

Fig. 16. Diferentes vías propuestas de toxicidad de la HCY en el SNC.



7.4. HOMOCISTEÍNA Y ALTERACIONES CONDUCTUALES.

Las excitotoxinas son una familia de aminoácidos excitadores (AAE) con propiedades excitatorias sobre las neuronas del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos. Diferentes estudios han demostrado que el SNC contiene distintos receptores para AAE, sugiriendo que ellos están involucrados en procesos fisiológicos como la memoria, el aprendizaje, la potenciación a corto y largo plazo, etc; sin embargo, también se relacionan con la generación de crisis y daño neuronal que ocurren en varios modelos experimentales de enfermedades convulsivas y neurodegenerativas (Vezzani, 1988). La HCY ha demostrado inducir crisis en animales adultos (Folbergrová, 1997), así como en animales inmaduros de experimentación (Kubova, 1995).

En nuestro estudio, las primeras manifestaciones de crisis clónicas (tiempo de latencia) aparecieron entre los 10 y 19 minutos después de la administración de la dosis de HCY (800 mg/kg); éstas crisis se repitieron durante varios minutos y todos los animales administrados las presentaron. Después, este período fue seguido por la manifestación de crisis tónico-clónicas, en donde alrededor del 64% de los animales administrados con HCY las presentaron (promedio del tiempo de latencia 69.4 minutos). Nuestros datos se asemejan a los descritos anteriormente por otros autores (Folbergrová, 1999). Estas manifestaciones conductuales fueron atenuadas por la administración del antagonista de los receptores para NMDA, el MK-801, siendo estos hallazgos similares a los encontrados en otros estudios, en donde se ha reportado que una propiedad de los antagonistas no competitivos como el MK-801, es la de no bloquear por completo la actividad epiléptica inducida por el ácido kaínico en todas las áreas cerebrales, sugiriendo una protección selectiva sólo en ciertas áreas (Clifford, 1990).

Es ampliamente conocido que el ON se produce en respuesta a la activación de receptores tipo NMDA. Recientes estudios empleando cultivos neuronales, rebanadas de cerebro y modelos de isquemia cerebral en animales, han implicado al ON como un mediador de la toxicidad del receptor NMDA; sin embargo, otros estudios usando similares protocolos han proporcionado

evidencias contradictorias con respecto al papel del ON en la neurotoxicidad (Connop, 1995).

Por lo respecta al uso del inhibidor neuronal de la SON, el 7-NI, encontramos que tiene un efecto protector sobre las crisis conductuales inducidas por la HCY, lo que sugiere una posible participación tóxica del ON. Estos datos se asemejan con los experimentos llevados a cabo por Jellestad y Gundersen, en donde utilizan un modelo de hipoxia para inducir crisis, y demuestran que el 7-NI aumenta el tiempo de latencia en la aparición de las crisis; sin embargo, también demuestran que el 7-NI en dosis altas que van de 10 a 30 mg/Kg tiene efectos secundarios sobre el comportamiento motor en general (Jellested y Gundersen, 2001). Esto también es observado en nuestro estudio, en donde el grupo tratado con 7-NI presenta alteraciones en el comportamiento con respecto al grupo control, y por lo tanto, no puede ser descartado que el efecto protector se debe en parte a su acción directa en la reducción de la actividad motora (Jellestad y Gundersen, 2001). El papel del 7-NI como un inhibidor de las crisis inducidas por agentes convulsivos es controversial; un estudio realizado en ratones a los cuales se les administró una dosis de 50 mg/Kg de 7-NI, reveló que éste fue ineficaz para inhibir las crisis inducidas por el pentilentetrazol; sin embargo, dado en combinación con otros agentes antiepilépticos (etosuxamida y clonazepam), incrementó la capacidad anticonvulsiva de éstos significativamente (Borowicz, 2000).

7.5. HOMOCISTEÍNA, LIPOPEROXIDACIÓN Y CONDUCTA.

La excesiva activación de los receptores para NMDA durante los eventos excitotóxicos o isquémicos produce ROS en el cerebro, tales como el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. La sobre estimulación del receptor también produce óxido nítrico, el cual ejerce sus efectos en la isquemia cerebral. La dualidad del ON podría estar relacionada a su capacidad para modular la producción de ROS (Lancelot, 1995). Al evaluar los efectos de la

administración de HCY en el comportamiento que presentaban las ratas, el tiempo de latencia que presentaron los animales administrados con HCY (10 a 19 min) fue semejante a los reportados por otros autores (Folbergová, 2000); sin embargo no hubo un patrón de conducta similar para todos los animales, ya que no todos presentaron las mismas manifestaciones conductuales, ni un número similar de repeticiones de las alteraciones. La mayoría de los animales presentaron mioclonías, masticación, movimientos de cabeza, movimientos de manos anteriores, fasciculaciones, sacudidas de perro mojado y crisis tónico clónicas generalizadas, aunque la causa de todas las diferencias en las proporciones de los patrones no es claro. Al explorar una posible correlación entre la LP en diferentes áreas del cerebro y los patrones conductuales, no encontramos efectos significativos en la LP en ninguno de los tratamientos contra el control, lo que nos sugiere que el patrón conductual originado por la administración de HCY en este modelo no es consecuencia directa de daño oxidativo en las diferentes regiones cerebrales estudiadas, sino que es el resultado de un evento excitatorio transitorio. Más aún, en un estudio realizado por Allen en ratas administradas con HCY intraperitonealmente y donde se determinaron varios aminoácidos en diferentes regiones mediante HPLC, antes y después de las crisis generadas por la administración de la HCY, se observó que existen cambios, tanto en los niveles de aminoácidos (GABA, glutamato, glicina, taurina, aspartato, glutamina) en varias regiones del cerebro de la rata, y que éstos cambios generados antes y durante el desarrollo de la crisis involucran áreas importantes de control motor tales como el hipocampo, una de las regiones más propensas a generar crisis (Allen, 1986). Aunque ellos no evaluaron patrones conductuales, estos datos sugieren que deben de existir regiones más propensas en el desarrollo de las crisis y que la HCY pudiera tener uno o varios sitios blanco, similar a lo que sucede con el ácido homocisteico, un aminoácido excitador que contiene también un grupo SH, y que se ha demostrado que genera diferentes patrones conductuales, dependiendo de la vía de administración. Esto sugiere que diferentes estructuras y/o circuitos se encuentran probablemente activados, dependiendo de la ruta (Folbergová, 2000).

Nosotros sugerimos que un mecanismo parecido podría estar ocurriendo con la HCY, que es un aminoácido excitador similar al ácido homocisteíco.

8. CONCLUSIONES

La hiperhomocisteinemia ha sido asociada con un incremento en el riesgo para el desarrollo de enfermedades vasculares periféricas, coronarias y venosas. El mecanismo preciso por el cual la HCY produce daño no ha sido completamente determinado.

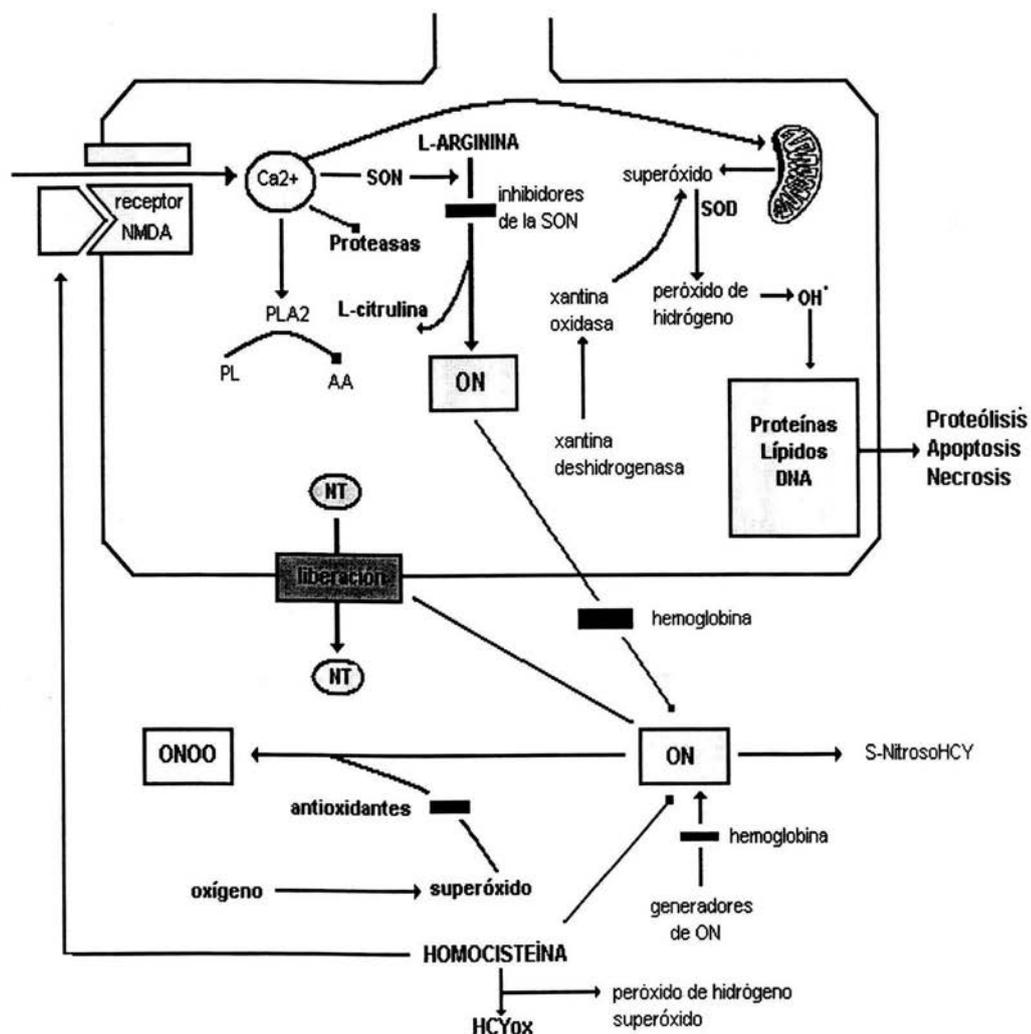
En este trabajo, se describe la acción peroxidativa de la HCY en sinaptosomas extraídos a partir de cerebro de rata, encontrándose que la HCY induce lipoperoxidación que es dependiente de la concentración, obteniéndose un efecto significativo desde una concentración de 100 μM . Esta lipoperoxidación es atenuada por la adición de N-acetil-L-cisteína, sin alcanzar valores basales. La comparación del poder oxidativo de la HCY con otros agentes oxidantes resultó similar al del glutamato y al del ácido 3-nitropropiónico, pero más al que el presentado por el ácido kaínico y el del ácido quinolínico. Estos datos, sugieren que en el mecanismo por el cual la HCY produce daño celular, se encuentra implicado el estrés oxidativo.

Por otra parte, la lipoperoxidación inducida por la HCY es inhibida por el MK-801, un antagonista no competitivo del receptor para NMDA a concentraciones muy bajas (5 μM), lo cual nos está sugiriendo que existe otro mecanismo que involucra excitotoxicidad en el daño inducido por ésta, actuando a nivel de receptores tipo NMDA. Todos estos hallazgos sugieren que el daño ejercido por la HCY, es fundamentalmente a través de la estimulación del receptor NMDA ya sea como un agonista del Glu en los receptores NMDA, como un modulador en el receptor NMDA, o en los receptores metabotrópicos del Glu, como un prooxidante, o en combinación de ambos mecanismos, dada la potencia que como oxidante exhibió la HCY en comparación con otros agonistas glutamatérgicos.

Por otro lado, el efecto protector presentado por los inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (SON) sobre la lipoperoxidación ejercida por la HCY, es contradictorio con los hallazgos de Won-Ki, que sugieren que el ON atenúa la neurotoxicidad inducida por la HCY en cultivos primarios de neuronas corticales, vía formación de S-nitrosotioles (S-NT) (Won-Ki, 1999). Se ha reportado que la

formación de S-NT también es una fuente de ON al sufrir rompimiento homolítico, el cual es dependiente del equilibrio existente entre los niveles de HCY y S-NT (D'Emilia, 1999); sin embargo la HCY puede seguir otra vía para la formación de ON, la cual es secundaria a la activación de los receptores tipo NMDA, provocando entrada de Ca^{2+} a la célula y formando NO inducida por la activación de la SON mediada por calmodulina/ Ca^{2+} , éste ON puede formar OONO^- al reaccionar con el O_2^- , el cual es un mecanismo ampliamente descrito (Garthwaite y cols., 1989), o bien la generación de ON podría ser a través de la formación de S-nitroso HCY, la cual, a bajas concentraciones de tioles, sufre ruptura homolítica para formar ON y OONO^- . Ambos mecanismos, solos o en combinación, apoyan el papel de los inhibidores de la SON contra la lipoperoxidación inducida por la HCY. En resumen, el mecanismo o los mecanismos por los cuales la HCY induce neurotoxicidad y estrés oxidativo, pueden depender de varios factores: activación de los receptores tipo NMDA y formación de ROS por oxidación de la HCY, en donde se dispara una serie de eventos secundarios como la activación de proteínas dependientes de Ca^{2+} (SON) y formación de ON para la producción de peroxinitrito y estrés oxidativo (fig. 16). Sin embargo, todos estos deben de ser elucidados en posteriores estudios.

Fig. 16. Mecanismos generales de daño celular propuestos para la HCY.



Por lo que respecta a la parte experimental in vivo, los datos obtenidos de la lipoperoxidación en diferentes áreas del cerebro de rata por la HCY y su posible correlación con los patrones conductuales que presentaron los animales, revelaron la total ausencia de dicha asociación, lo cual sugiere lo siguiente:

- 1) El tiempo de administración no fue el óptimo para evocar daño neuronal. Posiblemente se deba administrar crónicamente la HCY para poder detectar si existe lipoperoxidación regional.
- 2) Deben considerarse otros marcadores de daño celular, como la medición de Ca^{2+} intracelular, en paralelo con la evaluación de la LP.
- 3) La vía de administración de HCY pudo no ser la más adecuada. Una administración local, por microinyección, en las diferentes áreas, podría ser una opción, aunque también tiene sus limitantes, ya que como se mencionó anteriormente, la forma de administración puede variar las manifestaciones conductuales.

En general, la HCY parece tener varios mecanismos para producir daño neuronal; aunque existe generación de crisis conductuales, no necesariamente éstas deben de producir daño celular. Se sabe que la activación de receptores para aminoácidos excitadores produce una entrada de Ca^{2+} a las células nerviosas. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la entrada de Ca^{2+} precede a una respuesta neuronal y marca el inicio de crisis. Sin embargo, se ha demostrado que existe una cercana asociación entre crisis y cambios de Ca^{2+} extracelular, sugiriendo que la entrada de Ca^{2+} hacia la neurona puede estar involucrada causalmente en la génesis de fenómenos epilépticos por aminoácidos excitadores en el sistema límbico y que éste evento puede ser independiente de que ocurra daño neuronal (Vezzani, 1998). Por lo tanto, deben de hacerse más estudios para elucidar el mecanismo de acción de la HCY para producir daño neuronal y establecer si tiene una correlación con las manifestaciones conductuales.

9. BIBLIOGRAFIA.

- **Alfthan G.**, Pekkanen J., Jauhiainen M., Pitkaniemi J., Karvonen M., Tuomilehto J. et al. Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994;106:9-19.
- **Allen IC.**, Grieve A., Griffiths R. Diferencial changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures. *J. Neurochem.* 1986;46:1582-1592.
- **Aydin S.**, Ozaras R., Uzun H., Belce A., Zulú E., Tahan V., Altug T., Dumen E., Senturk H. N-acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002;198:71-77.
- **Beckman JS.** Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996;9:836-844.
- **Bellamy MF.**, McDowell IFW. Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine. *J. Inher. Metab. Dis* 1997;20:307-315.
- **Bergendi L.**, Benes L., Durackova Z., Ferencik. Chemistry, Physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999;65:1865-1874.
- **Boesgaard S.**, Aldershvile J., Pedersen F., Pietersen A., Madsen JK., Grande P. Continuous oral N-acetylcysteine treatment and development of nitrate tolerance in patients with stable angina pectoris. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1991;17:889-893.
- **Boje KM.**, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neural cell death. *Brain Res* 1992;587:250-256.
- **Borowicz KK.**, Luszczki J., Kleinrok Z., Czuczwar SJ. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, enhances the anticonvulsive action of ethosuximide and clonazepam against pentylenetetrazol-induced convulsions. *Jpn. J. Pharmacol.* 2001;86:297-301.

- **Boushey CJ.**, Beresford SAA., Omenn GS., Motulsky AG. A quantitative Assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049-1057.
- **Brattstrom L.**, Israelson B., Bergqvist D., Thorne J., Hultberg B., Hamfelt A. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis*, 1990;81:5160.
- **Brattstrom L.**, Wilcken DEL., Ohrvik J., Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease. The result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-2526.
- **Bredt DS.**, Snyder SH., Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:682-685.
- **Bredt DS.**, Snyder SH., Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* 1994;63:175-195.
- **Bredt DS.** and Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP level in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci. USA*; 1989;86:9030-9033.
- **Breteler MMB.** Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurology of Aging* 2000;21:153-160.
- **Carroll JE.**, Howard EF., Hess DC., Wakade CG., Chen Q., Cheng C. Nuclear factor-kappa B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment. *Mol Brain Res* 1998;56:186-191.
- **Clifford DB.**, Olney JW., Benz AM., Fuller TA., Zorumsky CG. Ketamina, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia* 1990;31:382-390.
- **Connop BP.**, Boegman RJ., Jhamandas K., Beninger RJ. Excitotoxic action of NMDA agonists on nigrostriatal dopaminergic neurons: modulation by inhibition of nitric oxide synthesis. *Brain Research* 1995;676:124-132.

- **Cotman CW.** and Matthews, OA. Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1971;249, 380-394.
- **Coyle JT.,** Murphy TH., Puttfarcken PS., Lyons EW., Vornov JJ. The non-excitatory mechanism of glutamate induced neurotoxicity. *Epilepsy Res* 1991;10:141-148.
- **Coyle JT.,** Puttfarrcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993;262:689-694.
- **Deckel AW.** Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. *J. Neurosc. Res.* 2001;64:99-107.
- **Delanty N.,** Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta. Neurol. Scand.* 1998;98:145-153.
- **D'Emilia DM.,** Lipton SA. Ratio of S-nitrosohomocyst(e)ine to homocyst(e)ine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci. Lett* 1999;265:103-106.
- **den Heijer M.,** Blom HJ., Gerrits WBJ., Rosendaal FR., Haak HL., Wijermans PW. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis?. *Lancet* 1995;345:882-885.
- **De Rosa JF.** Estado actual de la terapéutica antioxidante: Oxidación y antioxidación. *Rev Fed Arg Cardiol* 1998;27: 496-498.
- **Durand P.,** Prost M., Loreau N., Lussier-Cacan S., Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81:645-672.
- **Engbersen AMT,** Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;56:142-150.
- **Eikelboom JW.,** Lonn Eva., Genest J., Hankey G., Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Inter Med* 1999;131:363-375.
- **Finkelstein JD.,** Mudd HS., Laster FIK. Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: The mode of inheritance. *Science* 1964;146:785-787.

- **Folbergrova J.** Energy metabolism of mouse cerebral cortex during homocysteine convulsions. *Brain Res.* 1974;81:443-454.
- **Folbergrová J.,** Haugvicová R., Mareš. Behavioral and metabolic changes in immature rats during seizures induced by homocysteic acid: the protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Experim. Neurol.* 2000;161:336-345.
- **Folbergrova J.** Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Exp Neurol* 1997;145:442-450
- **Frosst P.,** Blom HJ., Milos R., Goyette P., Sheppard CA., Mathews RG., Boers GJH., den Heijer M., Kluijtmans LAJ., van der Heuvel LP., Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:11-113.
- **Garthwaite J.,** Charles SL., Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336:385-388.
- **Garthwaite J.,** Garthwaite G., Palmer RMJ., Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European j. Pharmacol.* 1989;172:413-416.
- **Gasic GP.,** Hollman M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Ann. Rev. Physiol.* 1992;54:507-536.
- **Goyette P.,** Summer JS., Milos R., Duncan AMV., Rosenblatt DS., Matthews RG., Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
- **Graham Y.,** Daly LE., Refsum HM. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-1781.
- **Gross SS.,** Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995;57:737-769.

- **Gutteridge JMC.**, Richmond R., Halliwell B. Inhibition of the iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 1979;15:469-472.
- **Haghighi SS.**, Johnson GC., de Vergel CF. Pretreatment with NMDA receptor antagonist MK801 improves neurophysiological outcome after an acute spinal cord injury. *Neurol Res.* 1996;18:509-515.
- **Halliwell B.**, Gutteridge JMC. In: *Free radicals in biology and medicine.* 1985. Pags 140-189. Claedon Press, Oxford.
- **Halliwell B.**, Gutteridge JMC., Cruss CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J.Lab. Clin. Med.* 1992;119:598-620
- **Hammond EJ.**, Hurd RW., Wilder BJ., Floyd JT. Focal and generalized experimental seizures induced by homocysteine. *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.* 1989;49:184-186.
- **Harmon DL.**, Woodside JV., Yarnell JWG., McMaster D., Young IS., McCrun., Gey KF., Whitehead AS., Evans AE. The common "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. 1996;89:571-577.
- **Hoogeveen EK.**, Kostense PJ., Beks PJ., Mackaay AJC., Jakobs C., Bouter LM. et. al. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:133-138.
- **Iadecola C.** Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *TINS* 1997;20: 132-138.
- **Jacobsen DW.** Hiperhomocysteinemia and oxidative stress. *Arterios. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:1182-1186.
- **Jacobsen DW.** Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem.* 1998;338:1833-1843.
- **Jellestad FK.**, Gundersen H. Behavioral effects of 7-nitroindazole on hyperbaric oxigen toxicity. *Pharm. Res.* 2001;18:1607-1612.

- **Kang SS.**, Cook HY., Norusis M., Messer JV. Protein-bound homocyst(e)ine: a possible risk factor for coronary artery disease. *J.Clin. Invest.* 1986;77:1482-1486.
- **Kang SS.**, Zhou J., Wong PWK., Kowalisyn J., Strokosh G. Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J. Hum. Genet.* 1988;43:414-421.
- **Kang SS.**, Wong PW., Susmano A., Sora J., Norusis M., Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-545.
- **Khan M.**, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J. Neurosci Res.* 2004;76:519-527.
- **Kiedrowski L.** Costa E, Wroblewski JT. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1992;58:535-541.
- **Knowles RG.**, Palacios M., Palmer RMJ., Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5159-5162.
- **Koenig H.**, Trout JJ., Goldstone AD., Lu CY. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain function and breakdown. *Brain Res.* 1992;588: 297-303.
- **Kraus JP.**, Molecular basis of phenotype expression in homocystinuria. *J. Inher. Met. Dis.* 1994;17:383-390.
- **Lancelot E.**, Callebert J., Lerouet D., Revaud M., Boulu RG., 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. *Neurosc. Lett.* 1995;202:21-24.
- **Lancelot E.**, Lecanu L., Revaud M., Boulu RG., Plotkine M., Callebert J. Glutamate induces hydroxyl radical formation in vivo activation of nitric oxide synthase in prague.Dawley rats. *Neurosc. Letters* 1998;242:131-134.

- **Lappas M.**, Permezel M., Rice GE. N-acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:1723-1729.
- **Levine SA** and Kidd Parris M. (1986). Antioxidant adaptation: Its role in free radical pathology. eds. Biocurrent Division, Allergy Research Group. 2d edn San Leandro Cal.
- **Lipton SA.**, Kim WK., Choi YB., Kumar S., D'Emilia DM., Rayudu V., Arnelle DR., Stamler J. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:5923-5928.
- **Loscalzo J.** The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 1996;98:5-7.
- **Malinow MR.** Hiperhomocyst(e)inemia: A common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis. *Circulation* 1990;81:2004-2006.
- **Martin LJ**, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Calliaau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998;46:281-309.
- **Maulik N**, Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Das DK. Nitric oxide-a retrograde messenger for carbon monoxide signaling in ischemic heart. *Mol. Cell. Biochem.* 1996;157:75-86.
- **McCully KS.** Homocysteine metabolism in scurvy, growth and atherosclerosis. *Nature* 1971;231: 391-392.
- **Meister A.** Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988; 263: 17.205-17.208.
- **Meldrum B.**, Gorthwarte J. Excitatory aminoacid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *EAA Pharmacology* 1990;11:379-386.
- **Menéndez A.**, Fernández-Brito JE. Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999;18:155-68.
- **Miner SE.**, Evrosvski J., Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: An update. *Clin Biochem* 1997;30:189-201.

- **Moncada S**, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Reviews* 1991;43:109-142.
- **Monje MI**, Chatten-Brown J, Hye SE, Raley-Susman KM. Free radicals are involved in the damage to protein synthesis after anoxia/aglycemia and NMDA exposure. *Brain Res* 2000;857:172-182.
- **Motulsky AG**. Nutritional ecogenetic: Homocysteine-related arterosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am. J. Hum Genet.* 1996;58:17-20.
- **Mudd SH.**, Levy HL., Skovby F., Disorders of transsulfuration. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. Pp. 1279-1327. Eds. Scriver Cr, Beadet AI, Sly Ws, Valle D, New York: McGraw Hill Inc., 1995.
- **Muir KW.**, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 1995;26:503-513.
- **Munke M.**, Kraus JP., Ohura T., The gene for cystathionine- β -synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and proximal mouse chromosome 17. *Am. J. Hum. Genet* 1998;42:550-559.
- **Nanri K.**, Montéco C., Springhetti V., Seylaz J., Pinard E. The selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, 7-nitroindazole, reduces the delayed neuronal damage due to forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1998;29:1248:1254.
- **Olney JW.**, Labruyere J., Wang G., Wozniak DF., Price MT., Sessar MA. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 1991;254:1515.1518.
- **Olszewski AJ.**, McCully KS. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Rad. Biol. Med.* 1993;14:683-693.
- **Perry IJ.**, Refsum H., BonaaKH., Ueland PM., Forde OH., Nordrehaug JE. Serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995;346:1395-1398.
- **Porceni CB.**, Cardin AL., Racine CL., Lauderback CM., Butterfield DA. Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochem. Int.* 2001;39:141-149.

- **Reiderer P.**, Sofic WD., Rausch B., Schmidt GP., Reynolds K., Jellinger MBH. Youdim: transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J.Neurochem.*1989;52:515-520.
- **Reinert MM.**, Bullock R. Clinical trials in head injury. *Neurol Res.* 1999;21:330-338.
- **Rodrigo J.** Alonso D., Fernández AP., Serrano J., López JC., Encinas JM., Fernández Vizarra P., Castro S., Peinado MA., Pedrosa JA., Richard A., Martínez-Murillo, SantaconaM., Ventura ML., Uttenthal RL. Nitric Oxide: síntesis, neuroprotection and neurotoxicity. *Anales de Salud.* www.cfnavarra.es/salud/anales7textos11/cobab.html. 1999.
- **Santamaría A.**, Galván-Arzate S., Lisý V., Ali S.F., Duhart H.M., Osorio-Rico L., Ríos C. and Št'astný, F. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *NeuroReport* 2001;12, 871-874.
- **Santamaría A.**, Ríos C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Letters* 1993;159:51-54.
- **Sekhon B.**, Sekhon C., Khan M., Patel SJ., Singh I., Singh AK. N-Acetylcysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain research* 2003;971:1-8.
- **Selhub J.**, Jacques PF., Wilson PWF., Rush D., Rosemberg IH. Vitamins and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly populations. *J. Am. Med. Assoc.* 1993;270:2693-2698.
- **Sibani S.**, Cristensen B., O'Ferrall E., Saadi I., Hiou-Tim F., Rosenblatt DS., Rozen R. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. 2000;15:280-287.
- **Snyder S.**, Bredt D. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharm Sci.*1991;12:125-128.
- **Stamler JS.**, Simon DI., Osborne JA., Mullins Mark E., Jaraki O., Michel T., Michel T., SingelDJ., Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide:

Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Pharmacology*.1992;89: 444-448.

- **Stamler JS.**, Osborne JA., Jaraki O., Rabbani LE., Mullins M., Singel D., Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides nitrogen. *J.Clin. Invest* 1993;91:308-318.
- **Stampfer MJ.**, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM., Upson B., Ullmann D., Tishler P. et. al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268:877-881.
- **Stampfer MJ.**, Malinow MR. Can Lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk?. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 328-329.
- **Starkebaum G.**, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986;77:1370-1376
- **Stehouwer CDA.**, Weijnenberg MP., van den Berg M., Jakobs C., Feskens EJM., Kromhout D. Serum homocysteine and risk of coronary heart disease and cerebrovascular disease in elderly men. *Arterioscl. thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:1895-1901.
- **Stein JH.**, McBride PE., Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. *Arch Intern Med* 1998;158:1301-1306.
- **Tsai JC.**, Wang H., Perrella MA., Yoshizumi M., Sibinga EN., Tan LC. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1996;97:146-153.
- **Tyagi SC.** Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am Physiol Soc.*1998:C396-C405.
- **Upchurch GR.**, Welch GN., Loscalzo J. Homocysteine, EDRF and Endothelial Function. *Nutrition*; 1996;supl.1290S-1294S.
- **Upchurch GR.**, Welch GN., Fabian AJ., Freedman JE., Johnson JL., Keaney JF., Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272: 17012-17017.

- **Ventura P.**, Panini R., Pasini MC., Scarpetta G., Salvioli G. A-acetyl-cysteine reduces homocysteine plasma levels after single intravenous administration by increasing tilos urinary excretion. *Pharmacol Res.*1999;40:345-350.
- **Ventura P.**, Panini R., Abati G., Marchetty G, Salvioli G. Urinary and plasma homocysteine and cysteine levels during prolonged oral N-acetylcysteine therapy. *Pharmacology* 2003;68:105-114.
- **Vezzani A.**, Wu HQ., Angelico P., Stasi MA., Samanin R. Quinolinic acid-induced seizures, but no nerve cell death, are associated with extracellular Ca²⁺ decrease assessed in the hippocampus by brain dialysis. *Brain Res* 1988;454:289-297.
- **Viña J.**, Viña JR., Sáez GT. Glutathione: metabolism and physiological functions. *Life Chem Reports* 1986; 4: 1-35.
- **Wall RT**, Harlan JM., Harker LA., Striker GE., Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for study of vascular injury. *Thromb Res* 1980;18:113-121.
- **Weihmuller FB.**, O'Dell SJ., Marshall JF., MK-801 protection against methamphetamine-induced striatal dopamine terminal injury is associated with attenuated dopamine overflow. *Synapse* 1992;11:155-163.
- **Welch GN.**, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N.Engl. J. Med.* 1998;338:1042-1050.
- **Welch GN.**, Evrovski J., Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem.* 1997;30:189-201.
- **Wen-Hsing C.**, Beth VA., Xing LG. High levels of dietary vitamin E do not replace cellular glutathione peroxidase in protecting mice from acute oxidative stress. *J. Nutrit.* 1999;129:1951-1959.
- **Wong EH.**, KempJA., Priestley T., Knight AR., Woodruff GN., Iversen LL. The anticonvulsivant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 1986;83:7104-7108.
- **Won-Ki K.** S-Nitrosation ameliorates homocysteine-induced neurotoxicity and calcium responses in primary culture of rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 1999;265:99-102.

- **Won-Ki K, Young-Sook P.** Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosc lett* 1996;216:117-120
- **Wood AM., Bristow DR.** N-methyl-D-aspartate receptor desensitisation is neuroprotective by inhibiting glutamate-induced apoptotic-like death. *J. Neurochem.* 1998;70:677-687.



Homocysteine-Induced Brain Lipid Peroxidation: Effects of NMDA Receptor Blockade, Antioxidant Treatment, and Nitric Oxide Synthase Inhibition

AURELIO JARA-PRADO^a, ALBERTO ORTEGA-VAZQUEZ^a, LETICIA MARTINEZ RUANO^a, CAMILO RIOS^b and ABEL SANTAMARIA^{c,*}

Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A. Insurgentes Sur # 3877, México D.F., 14269, México; ^b*Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A. México D.F., 14269, México;* ^c*Laboratorio de Aminoácidos Excitadores/Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A. México D.F., 14269, México.* absada@yahoo.com

(Received 01 October 2002; Revised 14 November 2002; In final form 16 November 2002)

The effect of homocysteine (HCY) on lipid peroxidation (LP), a current mechanism of oxidative neurotoxicity, was investigated in rat brain synaptosomes. LP was assessed by measuring the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) formed from synaptosomal fractions following HCY treatment. Increasing HCY concentrations (5-1000 μ M) enhanced the TBARS formation in brain synaptosomes in a concentration-dependent manner. When compared at equimolar concentrations (100 μ M), the oxidative potency of HCY was lower than that of the oxidant ferrous sulfate, similar to that produced by glutamate (Glu) and the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, and higher than that of the Glu agonists, kainate and quinolinate. The *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonist dizocilpine (MK-801) completely blocked the HCY-induced LP at concentrations from 5 to 1000 μ M, whereas the well-known antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) was less effective, but still protective against the HCY oxidative toxicity at higher concentrations (400 and 1000 μ M). Three nitric oxide synthase (NOS) inhibitors, 7-nitroindazole (7-NI), *N* ω -nitro-L-arginine (L-NARG) and *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), were also tested on HCY-induced LP at increasing concentrations. Both nonspecific NOS inhibitors (L-NARG and L-NAME) decreased more effectively the HCY-induced LP than did the selective neuronal NOS inhibitor, 7-NI. These results show that submillimolar concentrations of HCY can induce oxidative injury to nerve terminals, and this effect involves NMDAR stimulation, NOS activation, and associated free radicals formation.

Keywords: Homocysteine; Lipid peroxidation; Nitric oxide synthase; NOS inhibitors; NMDA receptor; MK-801; *N*-acetylcysteine; Free radicals

INTRODUCTION

Lipid peroxidation (LP), a common expression of oxidative stress, is a deleterious process affecting membrane lipids as the result of free radicals attack (Nakazawa *et al.*, 1996). A cell membrane whose phospholipids undergo peroxidation becomes rigid, loses channel function, and fails to preserve its own integrity. The disruption of membrane permeability or its fragmentation leads to Ca²⁺ influx and irreversible cell destruction (Nakazawa *et al.*, 1996). LP is particularly active in isolated nerve terminals presenting *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) in their membrane surfaces (Štátný *et al.*, 1999). Since several excitatory agents such as glutamate (Glu) and its agonists evoke oxidative stress in brain tissue after NMDAR stimulation and increased Ca²⁺ influx, LP has been involved in NMDAR-mediated excitotoxic injury (Coyle and Puttfarcken, 1993; Santamaría *et al.*, 2001).

Homocysteine (HCY), a naturally occurring amino acid containing a reactive sulfhydryl group (-SH), is related with the pathologic condition known as hyperhomocysteinemia, when its levels (and its disulfide, homocystine) are increased in blood (Jacobsen, 2000). Hyperhomocysteinemia is a vascular human disorder caused by deficiencies of key enzymes controlling HCY levels (McCully, 1969), and it has been associated with arteriosclerosis and stroke. The toxicity exerted by HCY on endothelial vascular cells has been attributed to its

capability to produce highly cytotoxic reactive oxygen species (Jacobsen, 2000), while, in nerve tissue - particularly in cultured cortical neurons and cerebellar granule cells -, HCY toxicity has been related with NMDAR activation (Kim and Pae, 1996; Lipton *et al.*, 1997) and its consequent oxidative damage (Kim and Pae, 1996).

Conversely, nitric oxide (NO), a highly-diffusible molecule with physiological activity in the brain, is known to be a cellular messenger (Moncada *et al.*, 1989; Bredt and Snyder, 1990; Garthwaite, 1991), also exerting neurotoxic effects, depending either on its redox status (Lipton *et al.*, 1993; Snyder, 1993) or its concentrations (Kashii *et al.*, 1996). Consequently, NO has been currently related with pathological events such as apoptosis, oxidative stress and cell damage (Rubbo *et al.*, 1994), involving the Ca^{2+} -calmodulin- (Ca^{2+} /CAM-) dependent activation of constitutive nitric oxide synthase (eNOS) after NMDAR activation (Garthwaite *et al.*, 1989; Kiedrowski *et al.*, 1992). The role of NO as a potential factor to induce toxicity has been reported in several models, including excitotoxic conditions produced by glutamate agonists, such as quinolinic acid (Santamaría *et al.*, 1997; Pérez-Severiano *et al.*, 1998; Santamaría *et al.*, 1999), as well as in neurotoxic events, such as those produced by methamphetamine (Imam *et al.*, 1999), and these effects are likely to be mediated by the formation of peroxynitrite (Noack *et al.*, 1998; Imam *et al.*, 1999), a highly toxic molecule produced by interaction of NO with superoxide anion. Although it has been recently reported that the sulfhydryl group of HCY may react with NO, producing HCY nitrosation, and this effect may ameliorate HCY-induced neurotoxicity and calcium responses in primary cultures of rat cortical neurons, the precise role of NO on HCY neurotoxicity remains to be elucidated in light of the evidence mentioned above suggesting a possible neurotoxic role of NO. Therefore, in order to provide further information on the mechanisms of toxicity elicited by HCY in brain tissue, in this work we tested the effects of NMDAR blockade by dizocilpine (MK-801) (Santamaría and Ríos, 1993; Šťastný *et al.*, 1999), as well as NOS inhibition by either a selective neuronal NOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI), or the nonspecific NOS inhibitors *N* ω -nitro-L-arginine (L-NARG) and *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on HCY-induced LP in brain tissue. In addition, since HCY toxicity has been associated with free radical formation, we also tested the effect of *N*-acetylcysteine (NAC) as an antioxidant and precursor of glutathione (GSH) (Pocernich *et al.*, 2001). For these purposes, brain synaptosomes represent a useful tool because this biological preparation behaves as metabolically autonomous minicells.

METHODS

Reagents

MK-801 was obtained from RBI (Natick, MA, USA). All other reagents, including HCY, were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) or Merck (Mexico). Deionized water (Milli R/Q System, Millipore) was used for preparation of all solutions.

Isolation of Brain Synaptosomes

Adult male Wistar rats (250-300 g) were housed 3 per cage under controlled standardized laboratory conditions, with food and water *ad libitum*. Animals were sacrificed by decapitation and their brains removed on ice. Animal sacrifice was carried out in accordance with the institutional guidance and general recommendations on the use of animals for scientific purposes, avoiding unnecessary pain. Crude synaptosomal P_2 fractions were isolated from whole brains, according to a previous report (Corman and Matthews, 1971). All reagents employed throughout the study were prepared in deionized water.

Treatments and Assay of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was estimated in isolated synaptosomes by the assay of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) formation, according to a modified method (Santamaría *et al.*, 2001) from an original report (Ríos and Santamaría, 1991). Briefly, the synaptosomal fractions (970 μl aliquots) were incubated in a 40 mM Tris plus 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) containing a subpathological concentration of glycine (10 μM) to evoke stimulatory activity of HCY on the NMDAR (Lipton *et al.*, 1997). Incubation was done at 37°C for 60 min in the presence of increasing concentrations of either HCY, MK-801, NAC, 7-NI, L-NARG and L-NAME (all 5-1000 μM), or their combinations (final volumes adjusted to 1000 μl). An additional set of experiments was performed to compare the effect of HCY with the oxidative potency evoked by other agents, and included the incubation of synaptosomes in the presence of equimolar concentrations (100 μM) of either HCY, glutamate (Glu), different Glu agonists such as quinolinate (QUIN) and kainate (KA), the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NPA), or a well-known peroxidant agent (iron as FeSO_4). After incubation, samples were mixed with 2 ml of the TBA reagent (0.375 g thiobarbituric acid + 15 g trichloroacetic acid + 2.5 ml HCl). The reaction was controlled by addition of 10 μl desferrioxamine (1.5 mM) and 10 μl butylated hydroxytoluene (3.75% w/v) to the mixture. Final solutions were heated in a boiling water bath for 30 min and centrifuged at 3000g for 15 min. Optical density was measured in supernatants at

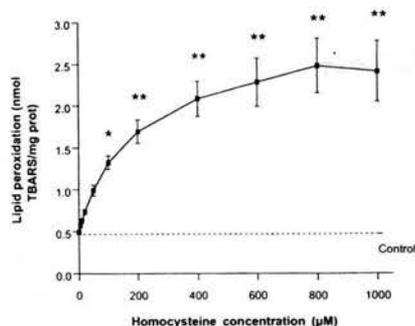


FIGURE 1 Concentration-response effect of homocysteine (HCY) on lipid peroxidation assessed by the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in rat brain synaptosomal P₂ fractions. Each bar represents the mean \pm S.E.M. from 6 experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate statistical differences from control (without HCY); one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

532 nm. Results were expressed as nmol of TBARS formed per mg of protein.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons against control. Values of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered statistically significant.

RESULTS

Concentration-Dependent Increase in TBARS by HCY

Incubation of rat brain synaptosomes in the presence of increasing concentrations of HCY resulted in a concentration-dependent enhancement of TBARS formation (FIG. 1), attaining significant levels at concentrations between 100 and 1000 μ M (167% to 396%, respectively, as compared to the control value). Since 100 μ M was the minimal concentration of HCY needed to attain a significant effect on TBARS formation, we characterized the oxidative properties of HCY under the proposed experimental conditions using this particular concentration.

Comparative Effects of HCY vs Other Toxins on Lipid Peroxidation

The oxidative potency of HCY in synaptosomal fractions was also compared with different agents at equimolar

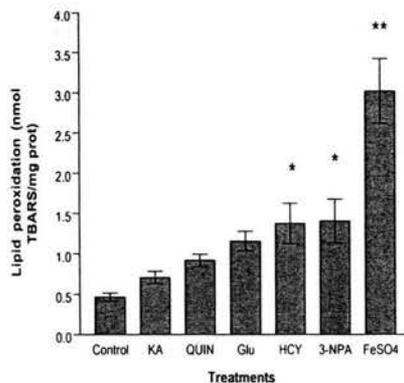


FIGURE 2 Comparative effects of homocysteine (HCY), kainate (KA), quinolinate (QUIN), glutamate (Glu), 3-nitropropionic acid (3-NPA), and ferrous sulfate (FeSO₄) on lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. Equimolar concentrations (100 μ M) of each agent were added to synaptosomes in incubation. Each bar represents the mean \pm S.E.M. from 5 experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate statistical differences from control (without HCY); one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

concentrations. Among these agents, we included excitotoxic molecules such as Glu and its agonists KA and QUIN, the mitochondrial toxin 3-NPA, and the well-known oxidant FeSO₄. HCY-induced TBARS formation was lower than that produced by FeSO₄ (-54%), similar to that exhibited by 3-NPA and Glu (-2% and 15%, respectively), and higher than that produced by the Glu agonists, QUIN and KA (50% and 94%, respectively) (FIG. 2).

Effects of MK-801 and NAC on HCY-Induced Lipid Peroxidation

In order to test whether the HCY-induced lipid peroxidation is mediated by NMDA_R stimulation and / or by free radical-mediated oxidative stress, further experiments were performed in the presence of increasing concentrations of the NMDA_R antagonist MK-801, and the antioxidant agent NAC, respectively. Both agents decreased the HCY-induced TBARS formation in a concentration-dependent manner, although MK-801 was more effective than NAC in preventing lipid peroxidation (FIG. 3). MK-801 produced a significant attenuation of HCY-induced lipid peroxidation even at the lowest concentrations tested (-37% for 5 μ M, -45% for 10

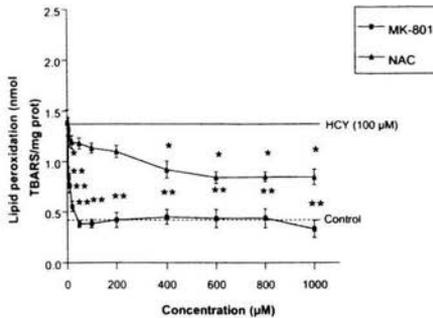


FIGURE 3 Concentration-response effects of dizocilpine (MK-801) and *N*-acetylcysteine (NAC) on homocysteine (HCY)-induced thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) formation in rat brain synaptosomal P₂ fractions. MK-801 and NAC were added independently to synaptosomes in incubation exposed to HCY (100 µM). Mean \pm S.E.M. from 6-14 experiments are represented. * p < 0.05 and ** p < 0.01 indicate statistical differences from control (with HCY alone); one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

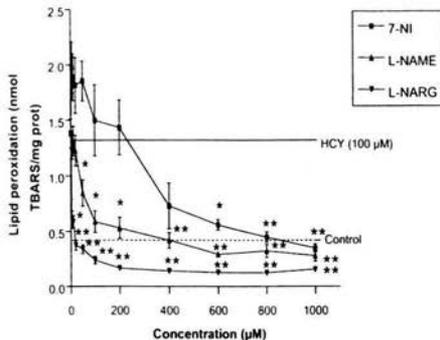


FIGURE 4 Concentration-response effects of 7-nitroindazole (7-NI), *N* ω -nitro-L-arginine (L-NARG) and *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on homocysteine (HCY)-induced thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) formation in rat brain synaptosomal P₂ fractions. All nitric oxide synthase inhibitors were added independently to synaptosomes in incubation exposed to HCY (100 µM). Mean \pm S.E.M. from 7-14 experiments are represented. * p < 0.05 and ** p < 0.01 indicate statistical differences from control (with HCY alone); one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

µM, and -60% for 20 µM, as compared to HCY alone), resulting in complete prevention at concentrations between 50 to 1000 µM, whereas NAC produced significant attenuation of HCY-induced TBARS formation at concentrations between 400 and 1000 µM (-33% for 400 µM, -39% for 600 µM, -38% for 800 µM, and -39% for 1000 µM, all vs HCY alone).

Effects of 7-NI, L-NARG and L-NAME on HCY-Induced Lipid Peroxidation

The effects of increasing concentrations of the NOS inhibitors 7-NI, L-NARG and L-NAME on HCY-induced LP are shown in Fig. 4. Addition of L-NARG plus HCY to synaptosomal fractions in incubation resulted in a significant reduction of TBARS formation at all concentrations tested (5-1000 µM, -56% to -89% vs HCY alone, respectively), while L-NAME produced a significant protective effect against HCY-induced TBARS formation from 50 µM and up to 1.0 mM (-39% to -80% vs HCY alone, respectively). 7-NI significantly decreased HCY-induced LP at concentrations between 600 and 1000 µM (-60% to -75% vs HCY, respectively). The order of efficacy against HCY-induced LP among the NOS inhibitors was as follows: 7-NI < L-NAME < L-NARG.

DISCUSSION

General Findings

This report describes the peroxidative action induced by HCY in brain synaptosomes. Its major findings were: a) the concentration-dependent peroxidative effect of HCY in synaptosomes found at micromolar concentrations; b) the oxidative potency exhibited by HCY, which was similar to that of Glu, but higher than other Glu agonists; c) the concentration-dependent protective action of the NMDA_r antagonist MK-801 against HCY-induced oxidative damage, which was more effective than exhibited by the antioxidant and glutathione precursor NAC; and d) the protective effects that three different NOS inhibitors exerted on the HCY-induced lipid peroxidation. Taken together, these findings lead us to support previous observations on a toxic nature of HCY on its own, either as a Glu receptor stimulant (probably acting as a Glu agonist at the NMDA_r (Lipton *et al.*, 1997), as a modulator at the NMDA_r, or at metabotropic Glu receptors (Folbergrová *et al.*, 1997)), as a pro-oxidant molecule, or a combination of both, given the higher oxidative potency exhibited by HCY in comparison with some other Glu agonists.

HCY, Oxidative stress and NMDA Receptor

In the nervous system although HCY has been typically related with excitatory events, such as increased intracellular Ca^{2+} concentrations in cultured cortical neurons after NMDAR activation (Lipton *et al.*, 1997; Kim, 1999), and seizures as an expression of excitotoxicity (Folbergrová *et al.*, 1997), most of the attention of HCY toxicity has been focused on diseases such as hyperhomocysteinemia, affecting vascular cells. In such pathologic processes, the hypothesis of an active role of oxidative stress as the key toxic insult of HCY is strongly supported (Jacobsen, 2000), since elevated levels of HCY have been reported to produce lipid peroxidation, which seems to be the main risk factor for vascular injury under a considerable number of experimental and clinical conditions (Jones *et al.*, 1994; Jacobsen, 2000), involving iron-catalyzed peroxidative processes, such as that observed for low-density lipoprotein (Hirano *et al.*, 1994). In this study, the concept of oxidative stress induced by HCY is supported by observations of stimulated lipid peroxidation at submillimolar concentrations, considerable lower than those producing lactate dehydrogenase leakage and cell death in cerebellar granule cells (Kim and Pae, 1996). However, the preferential susceptibility of this effect to MK-801 instead of NAC suggests that the lipoperoxidative action of HCY is more likely due to excitotoxic events first related to NMDA receptors activation with associated free radical production (Lipton, *et al.*, 1997), as MK-801, a well-known NMDAR antagonist (Santamaría and Ríos, 1993; Štátný *et al.*, 1999), completely blocked the HCY oxidative toxicity at low concentrations. Therefore, it seems that the HCY-induced lipid peroxidation which is prevented by NAC, could be the result of free radical formation after excitotoxic events related with NMDAR activation. Moreover, a similar concentration of HCY (100 μM) used by others to produce damage to endothelial cells via the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) (Starkebaum and Harlam, 1986; Wall *et al.*, 1980), was also the minimal concentration needed to produce lipid peroxidation in our experiments, suggesting that the toxic mechanisms exerted by HCY both on endothelial and nerve cells could be partially sharing a similar component: excessive NMDAR stimulation and associated oxidative stress. This hypothesis is supported by evidence showing that NMDA-binding sites are also well-characterized in cerebral capillary membranes (Koenig *et al.*, 1992), and thus, the alterations produced by HCY in cerebrovascular disease might be the result of a cascade of toxic events following NMDAR activation and associated oxidative stress. Whether HCY is directly acting as an NMDAR agonist, or its excitatory actions are related with its interaction with NMDAR modulatory sites as suggested by Folbergrová and coworkers (1997),

its a question deserving further investigation. Nevertheless, it cannot be ignored that NAC, at concentrations from 400 to 1000 μM , also proved to be protective against HCY-induced lipid peroxidation, suggesting that at least a fraction of the oxidative action of HCY is sensitive to antioxidant treatment. In fact, although the protective action of NAC on HCY-induced lipid peroxidation was less effective than that exhibited by MK-801, it represents a relevant physiological finding in light of its antioxidant properties. NAC has been shown to be an important antioxidant molecule (Halliwell, 1991; Pocernich *et al.*, 2001), also exhibiting antiapoptotic (Deigner *et al.*, 2000; Kannan and Jain, 2000) and neuroprotective properties (Fontaine *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000). NAC mainly acts as a thiol reductant and GSH precursor (Pocernich *et al.*, 2001), directly scavenging hydroxyl radicals mainly formed from H_2O_2 , and there is evidence that H_2O_2 is a reactive oxygen species commonly formed by HCY (Wall *et al.*, 1980; Starkebaum and Harlam, 1986; Kim and Pae, 1996). Thus, it is likely that NAC could be reducing hydroxyl radicals generated from HCY-mediated H_2O_2 formation. Nevertheless, further studies are needed to support these considerations.

NOS Inhibition and HCY-Induced Lipid Peroxidation

Kim (1999) has recently suggested that NO attenuates HCY-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical neurons, ameliorating the adverse properties of HCY via *S*-nitrosylation. Since it is known that NO reacts with thiol groups to form *S*-nitrosothiols (Byler *et al.*, 1983), and *S*-nitrosothiols may exert both cytoprotective and antithrombotic properties against HCY toxicity in vascular endothelial cells (Stamler *et al.*, 1993), it seems that NO might initially represent a protective factor against HCY neurotoxicity. However, our results suggest the opposite situation, given that inhibition of NO synthesis in synaptosomal preparations by three different NOS inhibitors resulted in a significant attenuation of HCY-induced LP. Possible explanations of our findings are related to recent observations published by D'Emilia and Lipton (1999), suggesting that HCY-induced neurotoxicity is dependent on the ratio of *S*-nitrosohomocysteine (SNHCY) to HCY or other thiols: it has been demonstrated that nitrosothiols, such as nitrosohomocysteine, may undergo homolytic cleavage to produce NO and subsequent neurotoxicity via the reaction with superoxide anion (O_2^-) to form a highly reactive and toxic molecule, peroxynitrite (ONOO^-) (Lipton *et al.*, 1993). In addition, these authors found that micromolar concentrations of nitrosothiols, such as SNHCY, generate detectable amounts of NO, but in the presence of excess thiol, such as HCY, no free NO was available to form

OONO⁻. In light of these findings, we hypothesize that, under the experimental conditions we employed in this study (submillimolar concentrations of HCY in the presence of a subpathologic glycine concentration (10 μ M) sufficient to evoke HCY-induced NMDAR activation), HCY may follow two toxic pathways: a) micromolar levels of HCY might produce NO via direct NMDAR activation and subsequent Ca²⁺/CAM-mediated NOS-induced NO formation available for OONO⁻ formation after its reaction with O₂⁻, a mechanism currently described for conditions of NMDAR overactivation (Garthwaite *et al.*, 1989); or b) HCY might be reacting with NO generated from different sources to eventually form SNHCY by nitrosylation (Kim, 1999) at low levels, which in turn, in the absence of high concentrations of thiol groups (D'Emilia and Lipton, 1999), could be releasing NO to produce OONO⁻ and further oxidative stress. Both of these mechanisms, alone or in combination, support a protective role of NOS inhibitors against HCY-induced LP. In fact, these considerations may also serve as an additional explanation for the protective effect of NAC observed in this work, since NAC represents an effective source of thiols (Pocernich *et al.*, 2001), potentially available for modulation of nitrosothiol:thiol balance.

Moreover, we have previously reported that the use of nonspecific NOS inhibitors, such as L-NARG (Santamaría *et al.* 1997; Santamaría *et al.*, 1999) and L-NAME (Pérez-Severiano *et al.*, 1998), represents a consistent protective factor to reduce QUIN-induced NMDAR-mediated neurotoxicity and oxidative stress in different rat brain preparations. Furthermore, since 7-NI, a well-known selective neuronal NOS inhibitor previously reported as effective against neurotoxic insults such as those produced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinium ion (MPP⁺) (O'Byrne and Tipton, 2002), exhibited less potent antioxidant effect against HCY-induced LP as compared with L-NARG and L-NAME in our study, it is likely that both neuronal and endothelial forms of NOS are relevant to control NO levels and further HCY-induced oxidative damage.

In conclusion, the precise role of NO in HCY-induced neurotoxicity and oxidative stress depends on several factors, including glycine levels and NMDAR activation, triggering of Ca²⁺/CAM-dependent NOS activation and NO availability, rate of S-nitrosylation and S-nitrosothiol:thiol balance, and finally, peroxynitrite formation. Thus, this paradigm still remains to be elucidated in further investigations.

Acknowledgements

The authors wish to express gratitude to Dr. María Esther

Jiménez-Capdeville for her excellent comments.

References

- Bredt DS and SH Snyder (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 682-685.
- Byler DM, DK Grosser and H Sushi (1983) Spectroscopic estimation of the extent of S-nitrothiol formation by nitrite action on sulfhydryl groups. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 523-527.
- Cotman CW and OA Matthews (1971) Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 380-394.
- Coyle JT and P Puttfarcken (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
- D'Emilia DM and SA Lipton (1999) Ratio of S-nitrosohomocysteine to homocysteine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci. Lett.* **265**, 103-106.
- Deigner HP, U Haberkorn and R Kinscherf (2000) Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Invest. Drugs* **9**, 747-764.
- Folbergrová J, V Lisý, R Haugvicová and F Šťastný (1997) Specific [³H]glutamate binding in the cerebral cortex and hippocampus of rats during development: effect of homocysteine-induced seizures. *Neurochem. Res.* **22**, 637-646.
- Fontaine MA, JW Geddes, A Banks and DA Butterfield (2000) Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced *in vivo* oxidative stress and striatal lesions: insights into Huntington's disease. *J. Neurochem.* **75**, 1709-1715.
- Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* **14**, 60-67.
- Garthwaite J, G Garthwaite, RMJ Palmer and S Moncada (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* **172**, 413-416.
- Halliwell B (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* **42**, 569-605.
- Hirano K, T Ogihara, M Miki, H Yasuda, H Tamai, N Kawamura and M Mino (1994) Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. *Free Rad. Res.* **21**, 267-276.
- Imam SZ, JP Crow, GD Newport, F Islam, W Slikker Jr and SF Ali (1999) Methamphetamine generates peroxynitrite and produces dopaminergic neurotoxicity in mice: protective effects of peroxynitrite decomposition catalyst. *Brain Res.* **837**, 15-21.
- Jacobsen DW (2000) Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterios. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1182.
- Jones BG, FA Rose and N Tudball (1994) Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atherosclerosis* **105**, 165-170.
- Kannan K and SK Jain (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* **7**, 153-163.
- Kashii S, M Mandai, M Kikuchi, Y Honda, Y Tamura, K Kaneda and A Akaike (1996) Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res.* **711**, 93-101.
- Kiedrowski L, E Costa and JT Wroblewski (1992) Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **58**, 335-341.
- Kim W-K (1999) S-Nitrosation ameliorates homocysteine-induced neurotoxicity and calcium responses in primary culture of rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **265**, 99-102.

- Kim W-K and Y-S Pae (1996) Involvement of *N*-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett.* 216, 117-120.
- Koenig H, JJ Trout, AD Goldstone and CY Lu (1992) Capillary NMDA receptors regulate blood-brain function and breakdown. *Brain Res.* 588, 297-303.
- Lipton SA, YB Choi, ZH Pan, SZ Lei, HSV Chen, NJ Sucher, J Loscalzo, DJ Singel and JS Stamler (1993) A redox-based mechanism for the neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.
- Lipton SA, W-K Kim, Y-B Choi, S Kumar, DM D'Emilia, V Rayudu, DR Arnelle and JS Stamler (1997) Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5923-5928.
- Martínez M, AI Hernández and N Martínez (2000) *N*-acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Res.* 855, 100-106.
- McCully, K.S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 56, 111-128.
- Moncada S, RMJ Palmer and FA Higgs (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1709-1715.
- Nakazawa H, C Genka and M Fujishima (1996) Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J. Physiol.* 46, 15-32.
- Noak H, J Lindenau, F Rothe, R Asayama and G Wolf (1998) Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxicity-mediated neurodegeneration: Relation to oxidative and nitric stress. *Glia* 23, 285-297.
- O'Byrne, MB and KF Tipton (2002) Inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase significantly attenuates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) toxicity *in vitro*. *J. Neural Transm.* 109, 585-596.
- Pérez-Severiano F, B Escalante and C Ríos (1998) Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinic acid-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 23, 1297-1302.
- Pocernich CB, AL Cardin, CL Racine, CM Lauderback and DA Butterfield (2001) Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochem. Int.* 39, 141-149.
- Ríos C and A Santamaría (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* 16, 1139-1141.
- Rubbo H, R Radi, M Trujillo, R Telleri, B Kalyanaraman, S Barnes, M Kirk and BA Freeman (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 269, 26066-26075.
- Santamaría A and C Ríos (1993) MK-801, an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci. Lett.* 159, 51-54.
- Santamaría A, D Santamaría, M Díaz-Muñoz, V Espinoza-González and C Ríos (1997) Effects of *N* ω -nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol. Lett.* 93, 117-124.
- Santamaría D, V Espinoza-González, C Ríos and A Santamaría (1999) *N* ω -Nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices. *Neurochem. Res.* 24, 843-848.
- Santamaría A, S Galván-Arzate, V Lisý, SF Ali, HM Duhart, I Osorio-Rico, C Ríos and F Št'astný (2001) Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *NeuroReport* 12, 871-874.
- Snyder SH (1993) Janus faces of nitric oxide. *Nature* 364, 577.
- Stamler JS, JA Osborne, O Jaraki, LE Rabbani, M Mullins, D Singel and J Loscalzo (1993) Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.* 91, 308-318.
- Starkebaum G and JM Harlan (1986) Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 77, 405-410.
- Št'astný F, E Hinoi, K Ogita and Y Yoneda (1999) Ferrous iron modulates quinolinic acid-mediated [³H]MK-801 binding to rat brain synaptic membranes in the presence of glycine and spermidine. *Neurosci. Lett.* 262, 105-108.
- Wall RT, JM Harlan, LA Harker and GE Striker (1980) Homocysteine-induced endothelial cell injury *in vitro*: a model for the study of vascular injury. *Thromb. Res.* 18, 113-121.