

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de ciencias

COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA
TAURINA Y DE LAS VITAMINAS C Y E, PARA
CONTRARRESTAR EL DAÑO NEURODEGENERATIVO
CAUSADO POR LA APLICACIÓN DE 3-NP EN RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Directora de tesis: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA

MÉXICO, D. F.



Septiembre, 2004



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.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

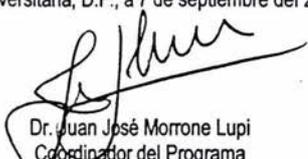
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de mayo del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **Rodríguez Martínez Ana Erika** con número de cuenta 93549033 y número de expediente 3991106, con la tesis titulada: "COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA TAURINA Y DE LAS VITAMINAS C Y E, PARA CONTRARRESTAR EL DAÑO NEURODEGENERATIVO CAUSADO POR LA APLICACIÓN DE 3-NP EN RATA", bajo la dirección del DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA

Presidente:	Dra. María Luisa Fanjul de Moles
Vocal:	Dr. Felipe Jiménez García
Vocal:	Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Vocal:	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Secretario:	Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia
Suplente:	Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales
Suplente:	Dr. Federico Martínez Montes

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de septiembre del 2004



Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesada

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis Dra. Selva Rivas Arancibia por todo su apoyo y dedicación a mi proyecto.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dra. Marcela Aguilar Morales, por sus comentarios, sugerencias y por el tiempo que dedicaron a este trabajo.

Quiero agradecer de manera muy especial, al Dr. Federico Martínez Montes y a la Dra. María Luisa Fanjul, por todo su tiempo y sus enseñanzas.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido formar parte de ella durante mucho tiempo.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo financiero.

A todas las personas que han contribuido de una u otra forma a la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres que siempre me han dado toda su confianza y apoyo, de quienes he recibido solo cosas bellas y de los cuales me siento muy orgullosa. Gracias por sus desvelos, por sus consejos, por su amor incondicional. Gracias por ser mis padres.

A Alfre y a Miguel, los mejores hermanos del mundo, que al igual que mis padres me han apoyado siempre. Gracias por estar conmigo siempre.

A Gaby, la mejor hermana y amiga del mundo. Gracias por estar a mi lado todo el tiempo, y por todo tú apoyo, gracias por ayudarme a que este momento fuera una realidad.

A mi familia, la mejor familia del universo.

ÍNDICE

1	Resumen.....	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Enfermedades Neurodegenerativas y Estrés Oxidativo.....	3
2.2	Neurodegeneración, Modelos Experimentales.....	5
2.3	Enfermedad de Huntington.....	10
2.4	Excitotoxicidad y Estrés Oxidativo.....	11
2.5	Antioxidantes y Daño Celular.....	14
2.6	Taurina.....	15
2.7	Vitamina C.....	17
2.8	Vitamina E.....	19
2.8	Planteamiento del problema.....	21
3	Hipótesis.....	22
4	Objetivo General.....	23
4.1	Objetivos Particulares.....	23
5	Materiales y Métodos.....	24
5.1	Peroxidación de Lípidos (LPO).....	26
5.2	Superóxido Dismutasa Cu/Zn (SOD-Cu/Zn).....	27
5.3	Glutación Peroxidasa (GPx).....	28
5.4	Análisis Estadístico.....	29
6	Resultados.....	30
6.1	Niveles de Peroxidación de Lípidos en el Hipocampo de Rata, 4 y 8 horas después de la Administración de los Fármacos.....	30
6.2	Niveles de Peroxidación de Lípidos en el Estriado de Rata, 4 y 8 horas después de la Administración de los Fármacos.....	33
6.3	Efecto de 3-NP sobre el Número total de Neuronas y Astrocitos en el Estriado (4h).....	36
6.4	Efecto de 3-NP sobre el Número total de neuronas y Astrocitos en el Estriado (8h).....	38
6.5	Descripción Morfológica.....	40
6.6	Actividad Enzimática de GPx en el Hipocampo de Rata, a las 4 y 8 horas después de la Administración de los Fármacos.....	52
6.7	Actividad Enzimática de GPx en el Estriado de Rata, a las 4 y 8 horas después de la Administración de los Fármacos.....	55
6.8	Actividad Enzimática de SOD en el Hipocampo de Rata, a las 4 y 8 horas después de la Administración de los Fármacos.....	58
6.9	Actividad Enzimática de SOD en el Estriado de Rata, a las 4 y 8 horas después de la Administración de los fármacos.....	61
7	Discusión.....	64
8	Conclusiones.....	71
9	Literatura citada.....	72
10	Anexo.....	84

1.- RESUMEN

El sistema nervioso central es especialmente sensible a los efectos de los radicales libres (RL), debido a que presenta un alto contenido de lípidos, una elevada tasa metabólica y bajas defensas antioxidantes enzimáticas como la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD). El ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) inhibe irreversiblemente a la enzima succinato deshidrogenasa, lo cual produce una disminución en la síntesis de ATP y un aumento en los niveles de RL. Por lo cual el objetivo de este estudio fue demostrar la relación que existe entre el estrés oxidativo causado por la administración de 3-NP y el proceso de neurodegeneración, así como utilizar este modelo para evaluar si los efectos antioxidantes de la taurina, vitamina C y E pueden revertir el daño causado por esta toxina. Para este estudio se utilizaron 120 ratas machos de la cepa Wistar, de 400-450 g. Los animales se dividieron en 5 grupos al azar (n= 24); cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos: Grupo 1) Control (solución salina). Grupo 2) 3-NP 20 mg/ kg. Grupo 3) 3-NP + taurina 43mg/kg. Grupo 4) 3-NP + vitamina C 100 mg/kg. Grupo 5) 3-NP + vitamina E 100mg/Kg. Cada grupo se dividió en 2 subgrupos, los cuales fueron evaluados a las 4 y 8 horas después de la administración de los distintos tratamientos. Cada grupo fue analizado por medio de técnicas bioquímicas (para la cuantificación de los niveles de peroxidación de lípidos, actividad de la GPx y SOD). Así como técnicas inmunohistoquímicas (contra la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) para el análisis morfológico de los astrocitos. Nuestros resultados muestran un incremento en los niveles de peroxidación de lípidos, tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo con el tratamiento de 3-NP. Cuando, después de la inyección con esta toxina se administro: taurina, vitamina C o vitamina E, los niveles de lípidos peroxidados disminuyeron significativamente, sin embargo no aminoran las alteraciones morfológicas producidas por la administración de 3-NP, a excepción del grupo tratado con taurina en el hipocampo. Además el número de células disminuye con todos los tratamientos estudiados. En este trabajo, encontramos daño astrocítico en el cuerpo estriado e hipocampo a las 4 y 8 horas después de la administración de 3-NP. La taurina es la única que tiene efecto importante, en preservar la morfología de las células que sobreviven. Los resultados mostraron una disminución en la actividad de La GPx tanto en hipocampo como en el cuerpo estriado a las 4 horas. Sin embargo, a las 8 horas no se observaron cambios en la actividad de esta enzima. En los grupos tratados con antioxidantes la actividad enzimática de GPx disminuye en ambos tiempos en el cuerpo estriado, mientras que en el hipocampo solo disminuye a las 8 horas. Por otro lado en el hipocampo, tanto a las 4 como a las 8 horas, los tratamientos con 3-NP producen un aumento en la actividad enzimática de la SOD total. Por el contrario, en el cuerpo estriado no se observan cambios en la actividad enzimática de la SOD total en el grupo tratado con 3-NP. Los resultados pueden indicar que el efecto antioxidante no protege de la muerte celular. Cuando se pierde el equilibrio de óxido-reducción las especies reactivas actúan sobre las células no solamente oxidando moléculas, si no también activando vías oxidativas intracelulares (como por ejemplo: activando vías que dependen de fosforilación, causando aumento de calcio intracelular, activación de caspasas y procesos de inflamación, entre otros). Una vez que estas vías se han activado, los antioxidantes parecen tener poco efecto. Con base en los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente: 1) La administración de 3-NP produce estrés oxidativo. 2) Todos los tratamientos estudiados presentaron efecto antioxidante ya que previenen el incremento en los niveles de la peroxidación de lípidos causado por la aplicación de esta toxina. 3) Ninguno de los tratamientos protege de la muerte celular causada por la administración de 3-NP. 4) La actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas (GPx y SOD), presenta diferencias entre el cuerpo estriado y el hipocampo. 5) La taurina es el único antioxidante que preserva la morfología en las células que sobreviven.

Abstract

The central nervous system is especially sensitive to the effects of free radicals (FR), caused by the presence of high concentrations of lipids, increased metabolic rates and low antioxidant enzyme defences like the glutathione peroxidase (GPx) and the superoxide dismutase (SOD). 3-NP inhibits irreversibly the succinate dehydrogenase, which produces a decreased of ATP synthesis and an increase in the FR levels. The objective of the present study is: Show the relation which exists between oxidative stress, caused by the administration of 3-NP and the process of neurodegeneration, and by which using the model for the evaluation of antioxidant effects of taurine, vitamin C, E with regards to regenerative capacity of the inflicted damage. For this study a total of 120 male Wistar rats, weight 400-450g were utilized. The animals were randomly selected and separated into 5 groups (n=24); each group was treated according to the following classification: Group 1) Control (salt solution), Group 2) 3-NP 20mg/kg Group 3) 3-NP + Taurine 43mg/kg Group 4) 3-NP + vitamin C 100mg/kg Group 5) 3-NP + vitamin E 100mg/kg. Each group was further divided into 2 subgroups, which were evaluated 4 or 8 hours after the administration of treatment. Each group was evaluated by means of immunohistochemical techniques (against the glia fluorescent acid protein (GFAP), for morphological analysis of astrocytes), as well as biochemical techniques (quantification of the lipid peroxidation levels, activity of SOD and GPx). Our results show an increase in the levels of lipid peroxidation, as well in the striatum as in the hippocampus following the treatment of 3-NP. In the current study the treatment with antioxidants: Taurine, vitamin C and E counteracted the increases in lipoperoxidation, trapping the free radicals, but were unable to affect the morphological alterations caused by 3-NP, with exception of the group that received treatment with taurine in the hippocampus. The cell number decreased with all treatments. In the current study we encountered damaged astrocytes in the striatum and the hippocampus after 4 and 8 hours after the administration of 3-NP. Vitamin C and E treatments were not effective in counteracting the damages inflicted by 3-NP. The results show diminutions in the activity of GPx in the hippocampus as well as in the striatum after 4 hours. After 8 hours there is no observable change in the activity of this enzyme. In groups treated with antioxidants the enzymatic activity of GPx diminished at both time in the striatum, while in the hippocampus it was only diminished after 8 hours. On the other hand in the hippocampus, after 4 hours as well as after 8 hours, produced an increase in the enzymatic activity of SOD overall. In contrast to the hippocampus in the striatum there were no observable changes in the levels of SOB following 3-NP treatment. In contrast to change in the hippocampus, in the striatum no changes in the enzymatic activity of SOD was detected attributed to 3-NP. That might indicate that the antioxidant effect does not inhibit cell death, when the equilibrium levels of oxide-reduction the reactive species act on the cellular activation oxidative pathway (like for example: activation pathway depend on phosphorylation, increases of intracellular calcium levels, activation of caspases, inflammation processes among others). Once these pathways have been activated, antioxidants appear to have little effect. On the basis of the results that we acquired it can be concluded the following: 1) The administration of 3-NP produces oxidative stress. 2) All of the treatments utilized were able to halt the increase of peroxidation caused by the toxin applied. 3) None of the treatments was capable of offering protecting from the cell death induced by 3-NP. 4) The activity of the antioxidant enzymes studied (GPX and SOB Cu/Zn) appear to have different properties in striatum and hippocampus. 5) Taurine is the only antioxidant capable of preserving the morphology in surviving cells.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y ESTRÉS OXIDATIVO

En las enfermedades neurodegenerativas, los radicales libres desempeñan un papel importante durante el proceso de daño y muerte celular.

Un radical libre es una molécula altamente reactiva por presentar uno o más electrones desapareados. Los radicales libres (RL) y las moléculas que se forman como parte de su metabolismo son denominadas especies reactivas. Las más comunes en el organismo son: las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las especies reactivas generadas a partir de metales de transición, como las de hierro (RFS) (Halliwell, 1999).

Cuando las defensas antioxidantes no son capaces de contrarrestar el aumento excesivo de los RL se ocasiona una pérdida en el equilibrio de oxidoreducción, lo cual causa un estado de estrés oxidativo en el organismo. Durante el estado de estrés oxidativo, el aumento de ROS produce oxidación de lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (DNA y RNA), así como de otras moléculas complejas (Halliwell, 1999). Se ha propuesto que la pérdida del equilibrio entre la oxidación y la reducción en el sistema nervioso central (SNC), pueden alterar el metabolismo normal de éste (Coyle, 1993). El SNC es especialmente sensible a los efectos del estrés oxidativo, debido a que presenta un alto contenido de lípidos y una elevada tasa metabólica. Aunado a lo anterior, el tejido cerebral presenta bajas defensas antioxidantes enzimáticas como la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). Sin embargo, la superóxido dismutasa (SOD) y compuestos antioxidantes no enzimáticos como los tocoferoles (o vitamina E), ascorbato (o vitamina C), caroteno, urato, ésteres de retinol y algunos aminoácidos como la

taurina, que desempeñan un importante papel en la protección celular.

El estado de estrés oxidativo, ha sido asociado a la fisiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas así como a otros estados patológicos como isquemia, traumatismo y edema cerebral, entre otros.

En el tejido cerebral postmortem de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA), se han estudiado algunos marcadores de estrés oxidativo, tales como el daño a DNA. Mecocci et al, en el año 1994 y Beal en el año 2000 reportaron un aumento significativo de la OH8dG en los pacientes con EA. Lo cual confirma la sensibilidad del DNA al daño oxidativo en esta enfermedad. Por otro lado en tejido cerebral postmortem, de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), se ha observado un aumento en los niveles de fierro (Jenner et al., 1998; Fitzmaurice et al, 2003), una disminución de la actividad en el complejo I de la cadena respiratoria y una disminución en los niveles de glutatión reducido (Jenner et al., 1998; Fitzmaurice et al, 2003). También se ha observado un incremento en lipoperoxidación y daño a DNA en sustancia nigra (Jenner et al., 1998; Fitzmaurice et al, 2003). Estas evidencias sugieren la importancia del estrés oxidativo, en el desarrollo del proceso patológico asociado a la EP. En otro tipo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington se han evaluado diferentes marcadores de estrés oxidativo, y se encontró en estos pacientes, un incremento en el glutatión oxidado (Sian et al, 1994; Browne et al 1997) y en la OH8dG (marcador de daño oxidativo al DNA) (Browne et al, 1997; Rebekah et al, 2000). Lo cual pone de manifiesto el papel de los radicales libres durante el proceso de neurodegeneración en dichas enfermedades.

2.2.- NEURODEGENERACIÓN Y MODELOS EXPERIMENTALES

Existen diversos modelos experimentales que son útiles en el estudio de algunas enfermedades neurodegenerativas, ya que son capaces de reproducir las características fisiopatológicas que se manifiestan en dichas enfermedades. Entre estos modelos se encuentra el uso de ratas tratadas con ácido 3-nitropropiónico (3-NP).

El 3-NP fue identificado como un metabolito del 3-nitropropanol, un agente tóxico responsable del envenenamiento del ganado de la zona occidental de Estados Unidos de Norteamérica. Los animales intoxicados con las plantas de la leguminosa (*Indigofera* o *Astragalus*) presentaron anomalías motoras y debilidad generalizada (Ludolph et al., 1991).

Hace algunos años se reportó que la ingesta de caña de azúcar contaminada con un hongo (*Arthrimum*), produjo altos niveles de 3-NP, causando encefalopatías agudas en humanos (Ludolph et al., 1991). Entre 1972 y 1989, se reportaron cerca de 900 casos de intoxicación: el 10% murieron y muchos otros presentaron pérdida de habilidades motoras de forma irreversible. Un número sustancial de sujetos desarrolló un daño neurológico persistente caracterizado por distonia, espasmos, gesticulaciones y movimientos bruscos o sacudidas; esta sintomatología se encuentra asociada a lesiones en los ganglios basales, principalmente en el putamen y núcleo caudado.

El 3-NP es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH). La SDH juega un papel central en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en la cadena de transporte de electrones (como un componente del complejo II). Esta enzima es responsable de la oxidación de succinato a fumarato (Alston et al.,

1977: Coles et al., 1979). La inactivación de la SDH por el ácido 3-NP requiere que el nitroalcano esté en su forma de carbanión. Coles y colaboradores (1979), propusieron la inactivación de la SDH por el 3-NP en dos etapas. En la primera etapa, el dianión de 3-NP es oxidado a 3-nitroacrilato por la transferencia de dos electrones del componente flavín. En la segunda etapa, el grupo tiol de SDH interactúa con el 3-nitroacrilato para formar un tioéter y el grupo flavín es reoxidado por la cadena respiratoria. La estructura química del 3-NP es muy similar a la del ácido succínico que se une al sitio catalítico de la enzima SDH, lo que podría explicar que el 3-NP ocupe dicho sitio y de esta manera se inhiba a la enzima (Brouillet et al., 1999). Se propone que el 3-NP, al inhibir a la SDH, produce una disminución en la síntesis de ATP, que a su vez provoca despolarización de la membrana, con la subsiguiente activación de receptores de tipo NMDA sensibles a voltaje y excitotoxicidad neuronal secundaria (Novelli et al., 1988; Fink et al., 1996).

Los niveles en la actividad metabólica entre las diferentes regiones del cerebro, podrían explicar la vulnerabilidad regional producida por el 3-NP (Alexi et al, 1998). Las áreas más vulnerables del cerebro a la toxicidad del 3-NP son el cuerpo estriado y el hipocampo, las regiones menos vulnerables son corteza y cerebelo (Alexi et al, 1998). Sin embargo aún no está totalmente explicado el daño regional producido por la administración sistémica de 3-NP (Geddes et al., 2000). Los mecanismos por medio de los cuales el 3-NP causa neurotoxicidad, son controversiales. La activación de receptores NMDA por glutamato podría jugar un papel importante en la muerte neuronal (Choi, 1990., Simpson e Isacson 1993) inducida por 3-NP (Wang-Tso Lee y Cheng Chang, 2004), ya que estudios previos

han demostrado que, neuronas con privación de energía son más susceptibles a la excitotoxicidad del glutamato que las neuronas energéticamente competentes (Novelli et al., 1988; Fink et al., 1996). Una clave importante acerca del mecanismo de la toxicidad del 3-NP fue la observación hecha por Pang y Geddes (1977), quienes establecieron que el daño neuronal producido por la administración sistémica de 3-NP podría en parte ser el resultado de un mecanismo excitotóxico.

Otros autores, también han sugerido que la disminución en el metabolismo energético, ocasionado por el 3-NP, origina muerte neuronal por un mecanismo excitotóxico y por la formación de RL (Schulz et al., 1995). La activación de los receptores a glutamato (NMDA), así como también alteraciones en la concentración de calcio intracelular y mitocondrial, podrían participando en el daño oxidativo producido por esta toxina (Lee et al 2002; Nars et al, 2003). Al parecer el 3-NP puede inducir muerte necrótica o apoptótica. La muerte necrótica, mediada por receptores NMDA, es atenuada por el antagonista, MK-801, de estos receptores, pero no previene totalmente la muerte celular, lo que sugiere mecanismos independientes de receptores NMDA (Weller y Paul, 1993; Fink et al, 1996; Pang y Geddes, 1977), tales como la activación de caspasas que llevan a la muerte celular apoptótica. La muerte apoptótica puede ser inducida por la entrada de calcio masivo a la célula, esta entrada masiva de calcio, produce una liberación de calcio de la mitocondria, lo cual conlleva a la formación del poro de transición mitocondrial, dando como resultado la liberación de citocromo C y una subsecuente activación de caspasas, lo cual produce la muerte celular por apoptosis (Wang-Tso and Chen Chang, 2004). También se ha demostrado, que el

estrés oxidativo producido por la inyección de 3-NP induce apoptosis neuronal dependiendo de la edad de los ratones (Gyung et al., 2001). Este estrés oxidativo podría también estar involucrado en la inducción de la apoptosis vía excitotoxicidad (Kim and Chan., 2001; Kim et al., 2000).

Estudios in vivo sobre la administración sistémica de 3-NP, han indicado que existe una gran vulnerabilidad del cuerpo estriado comparada con otras regiones cerebrales expuestas a 3-NP (Zeevalk et al., 1998). El rompimiento de la barrera hematoencefálica a nivel del cuerpo estriado, puede contribuir a la vulnerabilidad de esta estructura a 3-NP, (Nishino et al., 1995), así como a la inhibición metabólica y muerte de astrocitos, originando una hemorragia estriatal localizada (Nishino et al., 1997). Por otro lado la pérdida progresiva de la eficiencia en el metabolismo mitocondrial, producto de la administración de 3-NP, lleva al daño oxidativo y a la muerte celular. La mitocondria es el mayor productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neuronas. Existe evidencia del incremento en la producción de ROS en ratas tratadas con 3-NP (Shulz et al, 1996). En la neurotoxicidad producida por el 3-NP, la sobre producción de ROS que se da después de la entrada masiva de calcio al interior de la célula (Nars et al, 2003) puede también inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, el incremento de ROS, y la elevada concentración de calcio intracelular induce a la formación de el poro de transición mitocondrial con una subsecuente muerte celular (Kruman y Mattson, 1999). La producción de óxido nítrico (ON) también se incrementa con la administración de 3-NP, mediante la activación de la sintasa de óxido nítrico por el aumento de calcio intracelular, dando lugar a la producción de ON que puede reaccionar con el radical superóxido formando el radical peroxinitrito (Wang-Tso y

Chen Chang, 2004), aumentando así el daño que con lleva a la muerte celular.

El 3-NP produce disminución gradual en los niveles de ATP neuronal, lo que ocasiona que las bombas dependientes de ATP tengan un mal funcionamiento y no puedan regular los gradientes iónicos del interior celular (Geddes et al., 2000). Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado un incremento en el estrés oxidativo en neuronas tratadas con 3-NP (Geddes et al., 2000).

Por otro lado el 3-NP administrado intraestriatalmente produce una disminución en la actividad de la SOD, en ratas, (Santamaria A et al, 2001). Lo cual pone de manifiesto la formación de radical superoxido durante el daño producido por el 3-NP. También en ratones transgénicos para la enfermedad de Huntington se observa un aumento en la actividad de la SOD a las 19 semanas de edad de los ratones. Sin embargo a las 35 semanas se observa una disminución en la actividad de esta enzima. Estos cambios en la actividad de SOD indican que existe daño oxidativo y se este se encuentra asociado a alteraciones en el sistema antioxidante celular (Santamaría et al, 2001). El uso de modelos experimentales es importante para el estudio de algunas patologías, en este caso la EH.

2.3 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH), es una enfermedad hereditaria la cual se manifiesta en la vida media del individuo, se caracteriza por movimientos musculares anormales, pérdida progresiva de las funciones cognitivas y cambios de personalidad. Se observa muerte celular que afecta principalmente al caudado-putamen. Existe pérdida de neuronas GABAérgicas y colinérgicas, además de una disminución del ácido γ -aminobutírico (GABA), sustancia P, somatostatina, neuropéptido "Y" y dopamina (London et al, 1981; Dure et al, 1991). Algunos estudios han reportado disminución en el metabolismo de la glucosa y anomalías en las enzimas transportadoras de electrones en las mitocondrias de cerebros de pacientes con la EH (Beal et al., 1993). La administración sistémica de 3-NP en forma crónica, produce alteraciones que presentan características histológicas y neuroquímicas parecidas a las de la EH. El 3-NP inyectado intraestriatalmente a ratas y primates (no humanos), produce lesiones neuronales en forma dependiente de la dosis, esto se manifiesta con la presencia de la gliosis y pérdida neuronal. También existe una correlación directa entre la edad del animal y la muerte neuronal tanto en la administración sistémica como la intraestriatal (Broulliet et al, 1993; Koutouzis et al, 1994). Las características neuroquímicas del modelo son: disminución del GABA, de la sustancia P, de la somatostatina, del neuropéptido Y y la dopamina (Beal et al, 1993) así como el daño de neuronas GABAérgicas y colinérgicas (Alexi et al, 1998), y también sobre los astrocitos del cuerpo estriado, estos comienzan a edematizarse iniciando un proceso de daño que lleva a la muerte celular (Nishino et al., 1997).

2.4.- EXCITOTOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO

La excitotoxicidad y el estrés oxidativo son dos condiciones que conducen al daño y muerte celular, ambos factores son conocidos por su importancia en diversas enfermedades neurodegenerativas (Coyle y Puttfarcken., 1993). Ambos procesos pueden ser parte de un circuito de retroalimentación positiva, el cual se inicia por una disminución en la función mitocondrial, dando como resultado una insuficiencia de energía en la célula (Beal et al., 1993).

Se ha sugerido que las alteraciones neuroquímicas y neuropatológicas de la EH podrían en parte estar producidas por la sobreexcitación celular inducida por glutamato. El glutamato induce una sobre activación de receptores a aminoácidos excitadores, en especial receptores de tipo NMDA (Whetsell et al., 1993). Los mecanismos de excitotoxicidad se basan en la sobreexcitación de las neuronas, como resultado de una estimulación propagada y continúa de receptores a aminoácidos excitadores (NMDA entre otros), esto produce cambios y alteraciones en el metabolismo neuronal lo cual lleva a la muerte celular.

Las primeras que sugirieron un mecanismo excitotóxico en la HE se encontraron cuando las inyecciones de ácido kainico produjeron lesiones similares a las observadas en esta enfermedad (MacGeer et al., 1978). Aunado a lo anterior se ha obtenido evidencia de alteraciones mitocondriales, ya que usando imágenes de resonancia magnética se ha observado acumulación de lactato en los ganglios basales (Koroshetz et al., 1992).

También se ha propuesto, que transportadores defectuosos de glutamato son componentes importantes en las enfermedades degenerativas (Gu et al., 1996). Arzberger et al en 1997, encontraron una disminución en el RNAm de

transportadores de glutamato en el tejido estriatal postmortem de pacientes con EH. Entre estos mecanismos de daño podría jugar un papel importante la toxicidad dopaminérgica (Ben-Shachar et al., 1995). El cuerpo estriado está innervado por vías dopaminérgicas. Las lesiones causadas por el 3-NP parecen ubicarse en la parte lateral del estriado donde los receptores D2 se encuentran altamente concentrados (Nishino et al., 1997).

La coactivación de receptores de dopamina D1 y D2 da como resultado la activación de fosfolipasa A2 (Calabresi et al., 1996) y la liberación del ácido araquidónico, lo que lleva a un aumento en la producción de radicales libres (Dumuis et al., 1988), estos últimos también se producen por la oxidación de dopamina (DA) (Ben-Shachar et al., 1995). La disminución de vías dopaminérgicas en el estriado disminuye la muerte celular estriatal después de una isquemia global (Globus et al., 1988). Por este hecho se considera que la toxicidad dopaminérgica juega un papel importante en la selectiva vulnerabilidad estriatal al daño. También hay disfunción de la barrera hematoencefálica por la extravasación de IgG, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria, así como infiltración de neutrófilos y leucocitos (Nishino et al., 1997), además de una disminución y alteración en astrocitos. La intoxicación de humanos con 3-NP, produce daño neurológico caracterizado por distonia, espasmos y movimientos involuntarios de las extremidades (Broulliet, 1999). A nivel conductual, ratas tratadas con 3-NP, inicialmente presentan una hiperactividad a las dos semanas después de la administración del tratamiento, seguidas de hipoactividad a las 16 semanas después de administrado el tratamiento (Borlongan et al, 1995). En primates no humanos, la inyección de 3-NP (crónico), produce pérdida del tono muscular y

alteraciones en la actividad motora (Palfi et al, 1996). Por las características de las lesiones que produce, la administración de 3-NP a ratas y primates no humanos, es un buen modelo de la EH para evaluar posibles terapias experimentales (Beal et al., 1993), pero sobre todo, es un excelente modelo para estudiar la participación del estrés oxidativo durante el proceso de neurodegeneración y la protección que puede brindar el uso de antioxidantes.

2.4.- ANTIOXIDANTES Y DAÑO CELULAR

El papel de los antioxidantes en la protección contra el daño por RL ha revelado un complejo sistema de interacciones. Por ejemplo, la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble en las células, el cual protege a las membranas de la oxidación iniciada por radicales libres. Durante este proceso, la vitamina E es oxidada hacia el radical libre tocoferilo y este proceso puede ser revertido por la interacción con vitamina C. El ácido ascórbico puede donar un electrón al radical libre tocoferilo, regenerando al tocoferol de la forma oxidada a reducida; a su vez, la vitamina C puede reaccionar directamente con RL acuosos y suprimir su reactividad (Coyle y Puttfarcken., 1993). La taurina es un aminoácido libre sulfonado con propiedades antioxidantes, que protege a las neuronas de la muerte por excitotoxicidad y previene del daño metabólico causado por isquemia. Además, se ha demostrado que la liberación de taurina aumenta después del daño celular, y lo anterior se ha relacionado con los mecanismos de protección cerebral (Dawson R et al., 1996; Huxtable, 1992).

2.6.- Taurina

El ácido 2-aminoetanosulfónico fue aislado del toro (*Bos taurus*), y se conoce comúnmente como taurina.

La taurina es un aminoácido libre presente en altas concentraciones en el cerebro del recién nacido. No se incorpora a proteínas y es el aminoácido más abundante en tejidos como la retina (Huxtable, 1992). La taurina se ingiere con los alimentos y también se sintetiza a partir de la cisteína o metionina presente en la dieta. Entre sus funciones se encuentra la modulación de niveles de calcio, el mantenimiento de la osmolaridad y la estabilización de membranas (Huxtable, 1992). La recaptura de la taurina ocurre mediante un transportador dependiente de Na^+/Cl^- (Chesney et al., 1987), la localización del transportador y su estructura son similares a otros transportadores de neurotransmisores y coincide con el papel de la taurina como neuromodulador en SNC (Smith et al., 1992). Este aminoácido puede ser almacenado no solo en glia y cuerpos neuronales, si no también en las terminales nerviosas.

Se ha demostrado que la liberación de la taurina ocurre cuando la célula es despolarizada (Huxtable, 1989). Bajo condiciones normales la liberación puede ocurrir vía excitación, bajo condiciones patológicas (periodos de isquemia, estrés oxidativo, etc.) la taurina puede ser liberada por mecanismos relacionados a cambios en el volumen celular como un mecanismo protector que permite a la célula mantener su equilibrio osmótico (Shain y Martín., 1990; Dutton et al., 1991). La estimulación de receptores a glutamato induce un rápido incremento en la concentración de calcio intracelular y una disminución en el metabolismo energético mitocondrial, como consecuencia de la entrada masiva de calcio. Este

efecto puede ser bloqueado por antagonistas de receptores a glutamato, la taurina regula las concentraciones de calcio, bloqueando su entrada y conserva el metabolismo energético mitocondrial en presencia de glutamato (Abdeslem et al., 1999). Sin embargo los mecanismos por los cuales produce estos efectos no están claros.

Algunos reportes indican que la taurina actúa en una subclase de receptores GABA_A (Bureau y Olsen, 1991) y posiblemente en receptores a GABA_B (Contro y Oja, 1990). La taurina ejerce su efecto inhibitor a través de receptores a GABA, específicamente como un agonista de receptores a GABA_A (Bowery et al., 1983). También puede actuar como estimulador del crecimiento neuronal y la diferenciación celular (Redburn y Schousboe., 1987). Además ejerce un efecto como estabilizador de la membrana celular, este último aunado a su acción sobre receptores a GABA_A se ha relacionado con su actividad anticonvulsivante (Hayes et al., 1975).

Existe evidencia de que la taurina es sintetizada en astrocitos en el cerebro y puede participar en interacciones entre neuronas y glia (Rivas-Arancibia et al., 1999). La taurina juega un papel antioxidante durante la excitotoxicidad (Timbrell et al., 1995) protegiendo a las neuronas de la muerte causada por glutamato y ácido kaínico, siendo éste un mecanismo protector muy importante en el cerebro (Dawson et al., 1996). La taurina actúa a varios niveles sobre las células previniendo el daño, pero los mecanismos mediante los cuales ejerce sus funciones aún no están completamente claros.

2.7.- Vitamina C

La vitamina C (ácido ascórbico), es un componente soluble en agua y se considera una primera línea de defensa no enzimática contra los RL formados a partir del metabolismo celular. Se ha observado que el ácido ascórbico reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), radical peroxilo ($ROO\cdot$) y singulete de oxígeno (O_2^1) (Thompson y Goldin., 1995; Duell, 1996; Kitts, 1997). El ácido ascórbico actúa como un barredor de RL en plasma, atrapando a las especies reactivas antes de que reaccionen con membranas biológicas y con lipoproteínas. El producto de esta reacción es el radical ascorbilo, que es un radical libre muy poco reactivo. El radical libre ascorbilo puede reducirse en forma reversible hacia ácido ascórbico u oxidarse para formar ácido dehidroascórbico (Bendich et al., 1986). Los RL se han asociado con los efectos dañinos a las estructuras intracelulares y extracelulares, la función antioxidante del ácido ascórbico es importante para la protección de las funciones celulares. Se ha demostrado que el ácido ascórbico protege la cornea del conejo del daño provocado por los RL, inhibiendo la actividad de la lipoxigenasa de la cornea (Williams y Paterson, 1986).

Además de reaccionar directamente con los RL acuosos, el ácido ascórbico afecta directamente el balance entre los productos oxidativos y los mecanismos de defensa antioxidantes. La vitamina E es el principal antioxidante soluble en grasa, involucrado en la protección de las membranas celulares de la oxidación iniciada por los RL. En el proceso de protección contra la oxidación de ácidos grasos, el tocoferol (vitamina E) es oxidado hacia el radical libre tocoferilo. El ácido ascórbico puede donar un electrón al radical libre tocoferilo, regenerando de la forma

oxidada a la forma reducida del tocoferol (Bendich et al., 1986). La concentración de ácido ascórbico en las células fagocíticas encontradas en la sangre circulante, es muchas veces más elevada que en los glóbulos rojos y es aproximadamente 150 veces más alta que la concentración encontrada en plasma, estas células fagocíticas utilizan RL y otras moléculas altamente reactivas, que contienen oxígeno, para eliminar patógenos invasores. Sin embargo, en este proceso, las células y los tejidos pueden ser dañados por las especies reactivas, por lo tanto la acción antioxidante del ácido ascórbico es un mecanismo protector del daño oxidativo muy importante (Moser y Weber, 1983).

2.8.- Vitamina E

La vitamina E pertenece al grupo de vitaminas liposolubles, una de sus principales funciones es actuar como antioxidante, la vitamina E reacciona con los RL solubles en los lípidos de las membranas oxidándose (Bjornebue et al., 1990). Dentro de los agentes reductores de la vitamina E, se han descrito principalmente el ácido ascórbico y el glutatión. El ácido ascórbico regenera a la vitamina E por una vía no enzimática, mientras que el glutatión utiliza una vía enzimática. Se ha sugerido que la interacción con la vitamina C ocurre entre moléculas solubles en agua y lípidos de las membranas en la interfase membrana-citosol, lo cual pudiera funcionar también *in vivo* para la reparación de la vitamina E unida a la membrana (Chan, 1993).

El radical tocoferilo puede ser reducido a tocoferol por reacción con el glutatión, esta reacción es catalizada por la enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio, el cual juega un papel importante en el reciclaje de la vitamina E (Bender, 1992; Chow, 1985). Sin embargo, la absorción de la vitamina E es relativamente pobre, se ingiere unida a lípidos y sólo del 20 al 40% es absorbida (Bender, 1992). Esta absorción depende también de la capacidad de digerir y absorber las grasas. Los estudios en animales y humanos han demostrado que la bilis es esencial para su absorción. (Bieri et al., 1983). En modelos de experimentación animal se ha observado que la deficiencia de vitamina E en el embarazo produce la muerte y reabsorción del feto. En humanos, la deficiencia de tocoferol produce atrofia testicular y degeneración del epitelio germinal de los túbulos seminíferos, así como también se ha observado atrofia de los axones en células nerviosas; la

mayoría de los efectos de la deficiencia de vitamina E pueden ser atribuidos al daño de la membrana (Bender., 1992).

2.9.-Planteamiento del problema

Existen diferentes modelos que permiten el estudio de la participación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, aunque el estado de estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio en la oxidación-reducción la forma de inducir este estado puede variar de un modelo a otro. Por ejemplo, para generar un estado de estrés oxidativo en las células se han usado modelos, donde el exceso de radicales libres son generados a partir de la inhalación de ozono, en este modelo las especies reactivas de oxígeno secundarias a la exposición de ozono, viajan hasta el SNC produciendo daño oxidativo celular e iniciando secundariamente un déficit energético el cual contribuye aun más a mantener el desequilibrio redox que lleva al daño celular. Estudios hechos en el laboratorio demuestran que el uso de taurina, vitamina C, y vitamina E son capaces de proteger a las células del daño oxidativo inducido por ozono. En otros modelos, como por ejemplo, el uso de toxinas que actúan a nivel mitocondrial como el 3-NP, el estrés oxidativo se produce dentro de la célula, por una inhibición de la producción de ATP mitocondrial, en este caso, es el déficit energético, el que inicia el estrés oxidativo y lleva a un aumento de los ROS. Aunque las enfermedades neurodegenerativas que cursan con estrés oxidativo presentan daño y muerte neuronal, la génesis de este desequilibrio varía de una patología a otra. Nuestro interés es dilucidar si los distintos antioxidantes con diferente mecanismo de acción pueden prevenir el daño oxidativo inducido por el 3-NP.

3.- HIPÓTESIS

Si el daño causado por el ácido 3-NP está mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno; entonces el uso de antioxidantes será capaz de contrarrestar el efecto de los radicales libres protegiendo al tejido cerebral del estrés oxidativo.

Si las alteraciones producidas por la administración del ácido 3-NP implican la participación de diferentes vías de daño; entonces el efecto protector de los diferentes antioxidantes depende del nivel donde actúen estos fármacos.

4.- OBJETIVO GENERAL

Demostrar la relación que existe entre el estrés oxidativo causado por la administración de 3-NP y el proceso de neurodegeneración, así como evaluar si los efectos antioxidantes de la taurina, vitamina C y E pueden revertir el daño causado por este fármaco.

4.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Analizar la correlación entre los cambios de inmunoreactividad a GFAP de los astrocitos con cambios bioquímicos en la peroxidación de lípidos, y los cambios en las defensas antioxidantes endógenas (SOD y GPx) causado por la administración de 3-NP.

2.- Relacionar los cambios en la actividad de Superóxido Dismutasa y los cambios en la actividad de Glutathion peroxidasa con los diferentes tratamientos antioxidantes.

3.- Estudiar si las alteraciones encontradas pueden ser contrarrestadas por la administración de diferentes antioxidantes, así como comparar el grado de efecto protector entre los antioxidantes utilizados.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 120 ratas machos de la cepa Wistar, de 400-450 g de peso, las cuales se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparente, con libre acceso al agua y comida. Los animales se dividieron en 5 grupos al azar (n= 24); cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos: Grupo 1) Control (solución salina); grupo 2) 3-NP 20 mg/ kg; grupo 3) 3-NP + taurina 43mg/kg; grupo 4) 3-NP + vitamina E 100 mg/kg; grupo 5) 3-NP + vitamina C 100mg/Kg. El pH de la solución de ácido 3-NP se ajustó a 7.4. Todos los tratamientos se administraron intraperitonealmente (ip) 10 minutos después de la toxina. Cada grupo se dividió en 2 subgrupos: el primer subgrupo se evaluó 4 horas después de iniciado el tratamiento y en el segundo subgrupo la evaluación se realizó 8 horas después de la inyección de 3-NP. Las regiones analizadas son cuerpo estriado e hipocampo. Cada grupo fue evaluado por medio de técnicas de inmunohistoquímica, así como bioquímicas. Por medio de técnicas inmunohistoquímicas se evaluó la inmunoreactividad contra la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) para el análisis morfológico de los astrocitos. Las pruebas bioquímicas se realizaron por métodos espectrofotométricos: cuantificación de los niveles de peroxidación de lípidos, actividad de la superóxido-dismutasa y cuantificación de la glutatión-peroxidasa; los resultados fueron correlacionados con los cambios morfológicos y de inmunoreactividad de los astrocitos. Cuatro u ocho horas después de la aplicación del 3-NP, 6 ratas de cada subgrupo fueron anestesiadas profundamente y posteriormente perfundidas con amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7.4), durante 10 minutos e inmediatamente después con paraformaldeído al 4%. A continuación se extrajeron los cerebros y fueron transferidos a concentraciones

crecientes de sacarosa en amortiguador de fosfatos (pH 7.4). Los cerebros fueron cortados a 18 μm en un criostato y montados sobre un portaobjeto para llevar a cabo la inmunohistoquímica.

Las secciones de cada cerebro fueron permeabilizadas durante 1 h a temperatura ambiente con 0.3% de Tritón y 0.3% de lisina previamente incubado con 10% de suero normal de caballo. Posteriormente las secciones fueron lavadas con PBS y después incubadas con el anticuerpo primario a cuatro grados centígrados durante 24 horas. Las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Las neuronas fueron contadas en secciones de cerebros teñidas con la técnica de Kluver barrera (Klüver and Barrera., 1953), a través de la observación bajo el microscopio. Las secciones de cada cerebro fueron desparafinadas e hidratadas, después se recubrieron con una solución de luxol fast blue a 56°-60°C. Posteriormente las secciones fueron lavadas en alcohol al 95%, para remover el exceso de colorante. Se lavó con agua destilada y se comenzó la diferenciación por la inmersión en una solución de carbonato de litio. Las secciones fueron lavadas en una solución de alcohol al 70%, lavamos con agua destilada. Se incubo cada sección, 6 minutos a 57°C en una solución de violeta de cresilo. Se lavaron con alcohol del 95%, posteriormente se deshidrataron las secciones y se montaron con Permount.

El análisis histológico consistió en contar el número de células por campo, cuantificándose 10 campos en cada corte, analizando 3 cortes de cada animal y analizando 3 animales por grupo experimental (en total se analizaron 90 campos por cada grupo experimental). En ambos subgrupos (4 y 8 horas) se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

5.1.- Peroxidación de lípidos (LPO)

Se utilizó el kit LPO-CC de Kamiya, se fundamenta en que, en presencia de hemoglobina, los hidroperóxidos son reducidos a derivados hidroxil, los cuales causan oxidación del N-metilcarbamoil-3,7-dimetilamino-10H-fenotiacia (MCDP) que al unirse forma azul de metileno en una reacción equimolar cuantificándose colorimétricamente a 675 nm.

Para cuantificar los niveles de LPO se homogenizaron las muestras en PBS 1:10 (p/v), y se almacenaron a -70°C hasta el día del ensayo. Los homogenados de cada muestra fueron centrifugados, se tomó el sobrenadante y se le agregó el reactivo enzimático (lipoproteín lipasa, oxidasa ascórbica y amortiguador). La mezcla fue incubada durante 15 minutos a 37°C y el cromógeno 10- MCDP fue agregado junto con el amortiguador que contenía hemoglobina, esta mezcla fue incubada a 37°C por 15 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 675 nanómetros en un espectrofotómetro Jenway 6405 UV/VIS. Se realizó una curva de calibración utilizando un blanco de solución salina y uno de cumeno (50 nM/ml). Los resultados fueron calculados utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{LPO en nmol/ ml} = (\text{Es}-\text{Eb}) \times 50 / (\text{Estd} - \text{Eb})$$

En donde: Es= Absorbancia de la muestra, Estd= Absorbancia del cumeno, Eb= Absorbancia del blanco.

5.2.- Superóxido Dismutasa (SOD).

Fundamento de la técnica:

Se utilizó el Kit SOD-Assay 525 de OXIS, que esta basado en la oxidación de la 5,6, 6_a, 11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxibenzo (c) fluoreno (reactivo R2) con la SOD a pH alcalino (8.8) produciendo un compuesto con propiedad cromófora que se lee con espectrofotometría de absorción a un valor máximo de 525 nm. Esta reacción se ve interferida por reacciones con grupos tioles, por ejemplo los presentes en el sistema de glutation, por lo que fue necesario un minuto antes (del reactivo R2), la inhibición de éstos productos alternos con la adición del 1,4,6-trimetil-2-vinilpiridinio trifluorometanosulfato (reactivo 1).

Para cuantificar los niveles de SOD, se profundieron las ratas con una solución de NaCl al 0.9%, (pH 7), con 10 mg/ml de heparina. Se pesaron los tejidos y se homogenizaron en 9 volúmenes de solución de sacarosa 0.25 M. Los homogenizados se centrifugaron a 8500 x g a 4° C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante. Se adicionó, 40 microlitros del reactivo de extracción (etanol/cloroformo, 62.5 ml de etanol/37.5 de cloroformo, a 0-4° C) a 250 microlitros de sobrenadante. Se colocó en el vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 3000 g a 4° C durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa. En un tubo de ensayo se agregaron 900 microlitros del reactivo R1 (37° C) y 40 microlitros de la muestra, al mismo tiempo se realizaron 4 blancos donde se sustituyó la muestra con agua. A cada tubo se le adicionó 30 microlitros del reactivo R2 se agito en el vortex durante 5 segundos y se incubo 1 minuto a 37° C. Se agregaron 30 microlitros de R1, se agito de nuevo la muestra en el vortex por 5 segundos. Se transfirió el líquido a la cubeta del espectrofotómetro y se midieron

los cambios de absorbancia (525 nm). El blanco se corrió simultáneamente. Los resultados fueron analizados estadísticamente.

5.3.- Glutathion Peroxidasa (GPx)

Fundamento de la técnica:

Se realizó a través del Kit c-GPx-340 de OXIS, basado en la reacción enzimática entre la NADPH y el ter-Butil Hidroperóxido (t-BOOH) misma que se lee espectrofotométricamente a 340nm. Y la lectura es proporcional a la actividad de la GPX en la muestra

Los animales se anestesiaron y fueron profundidos con NaCl al 0.9%. Se tomó el tejido y se homogenizó en el amortiguador (incluido en el Kit de OXIS). El homogenado se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4° C. Se tomó la fase acuosa. Por otro lado, se colocaron en tubos de ensayo, 175 microlitros del amortiguador, 175 microlitros de NADPH y 70 microlitros de la muestra. Se transfirió el líquido a la cubeta del espectrofotómetro y se agregó 175 microlitros de hidroperóxido de terbutil. Se midieron los cambios de absorbancia (340 nm). El blanco se corrió simultáneamente. Los resultados fueron analizados estadísticamente.

5.4.- Análisis estadístico

Los resultados de los niveles de peroxidación de lípidos, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, así como también el análisis citológico se analizaron estadísticamente con pruebas no paramétricas. Después de aplicar la prueba de Bartlett para determinar si las varianzas eran homogéneas, se utilizó estadística no paramétrica como la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias estadísticas entre grupos y a continuación una prueba de Dunnett para comparar estadísticamente cada uno de los grupos con el grupo control y el grupo con 3-NP.

6.- RESULTADOS

6.1.- Niveles de peroxidación de lípidos en el hipocampo de rata, 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

LPO 4 horas después de la administración de los fármacos

Los resultados muestran un aumento en los niveles de los lípidos peroxidados a las 4 horas en el grupo tratado con 3-NP, así como una disminución en los niveles de lípidos peroxidados en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes (gráfica 1).

Al analizar estadísticamente los grupos con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos diferencias significativas $P < 0.01$. Al comparar el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina E ($P < 0.01$) el grupo tratado con 3-NP + vitamina C no muestra diferencias significativas contra el grupo control (gráfica 1).

Cuando se analiza estadísticamente el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes, las diferencias son estadísticamente significativas con la prueba de Dunett: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 1).

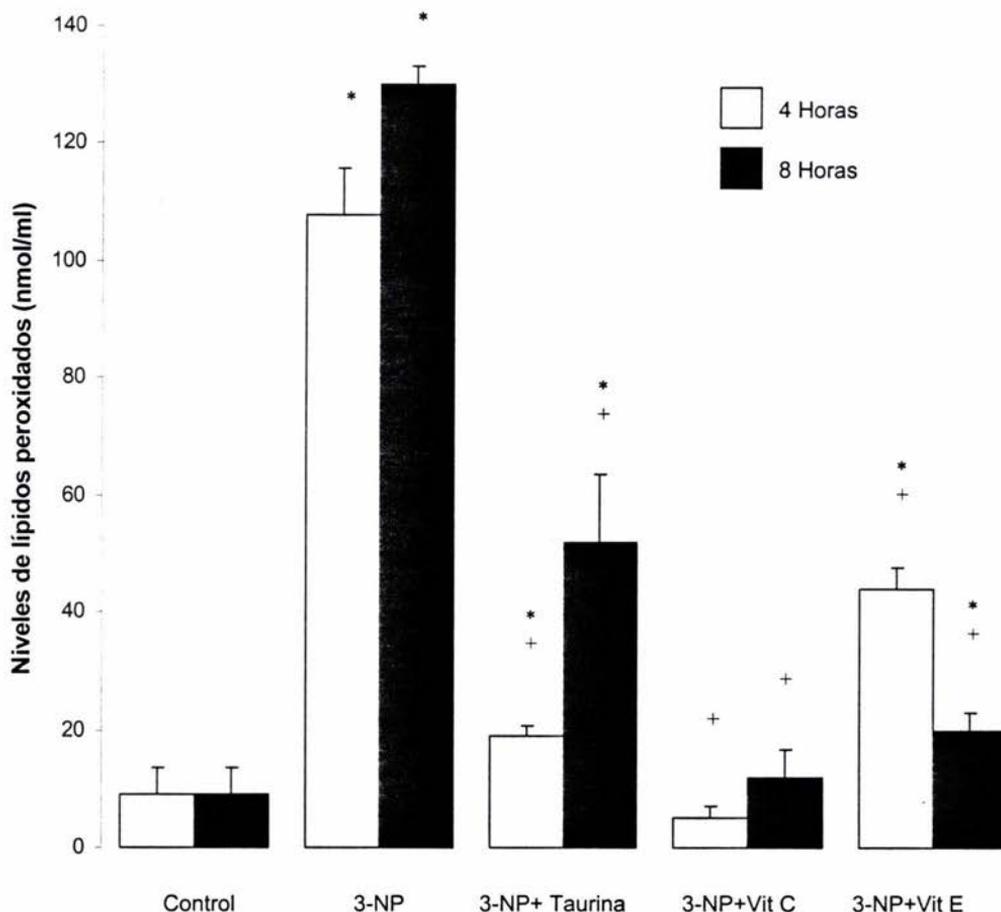
LPO 8 horas después de la administración de los fármacos

Al igual las 4 horas, los resultados muestran un aumento en los niveles de los lípidos peroxidados a las 8 horas en el grupo tratado con 3-NP, así como una disminución en los niveles de lípidos peroxidados en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos diferencias significativas $p < 0.01$. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) el grupo tratado con 3-NP + vitamina C no muestra cambios significativos con respecto al control (gráfica 1).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes presentan diferencias estadísticamente significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 1).

Niveles de peroxidación de lípidos en hipocampo



Gráfica 1. Efecto del 3-NP sobre los niveles de peroxidación de lípidos, en hipocampo de rata, 4 y 8 horas después de su administración.

Cada barra (n= 6) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan los niveles de peroxidación de lípidos a las 4 horas y las barras negras a las 8 horas después de aplicados los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

6.2.- Niveles de peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado de rata, 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

LPO 4 horas después de la administración de los fármacos:

Los resultados muestran un aumento en los niveles de los lípidos peroxidados a las 4 horas en el grupo tratado con 3-NP, así como una disminución en los niveles de lípidos peroxidados en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos diferencias significativas $P < 0.01$. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 2).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes hay una disminución estadísticamente significativa: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E ($p < 0.05$) (gráfica 2).

LPO 8 horas después de la administración de los fármacos:

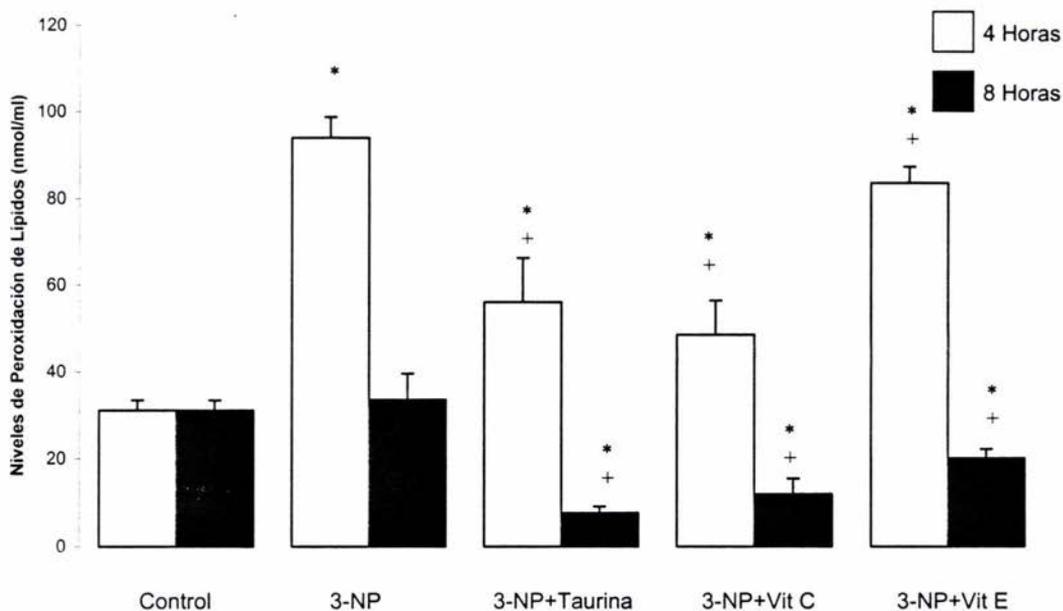
Los resultados no muestran en los niveles de los lípidos peroxidados a las 8 horas en el grupo tratado con 3-NP, sin embargo si se observa una disminución en los niveles de lípidos peroxidados en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control no encontramos diferencias significativas. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 2).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-

NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes hay una disminución estadísticamente significativa: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 2).

Niveles de peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado



Gráfica 2. Efecto del 3-NP sobre los niveles de peroxidación de lípidos, en estriado de rata, 4 y 8 horas después de su administración.

Cada barra (n= 6) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan los niveles de peroxidación de lípidos a las 4 horas y las barras negras a las 8 horas después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

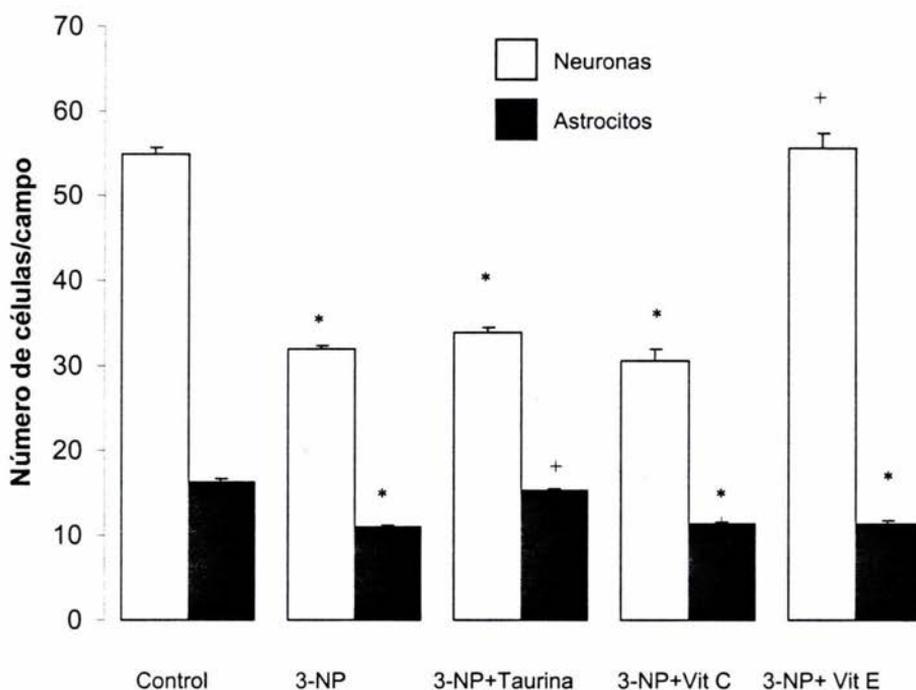
6.3.- Efecto de 3-NP sobre el número total de neuronas y astrocitos en el cuerpo estriado (4h).

Los resultados muestran una disminución en el número de neuronas a las 4 horas en el grupo tratado con 3-NP, así como una disminución en el número de neuronas en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes, excepto en el tratamiento con 3-NP + vitamina E, en donde el número de neuronas no cambió con respecto al control. El número de astrocitos disminuyó en el grupo tratado con 3-NP, 3-NP + vitamina C y 3-NP + vitamina E. En el grupo tratado con 3-NP + taurina no se observó ningún cambio con respecto al control.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ entre grupos. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos disminución significativa $P < 0.01$. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) tanto en neuronas como en astrocitos. El grupo que recibió 3-NP + vitamina E no presenta cambios significativos en el número de neuronas, con respecto al control, pero se observa una disminución significativa en el número de astrocitos ($p < 0.01$) (gráfica 3).

Cuando se compara con la prueba de Dunett, el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes hay cambios estadísticamente significativos: 3-NP + taurina ($p < 0.01$) en astrocitos, y 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) para neuronas.

Número de neuronas y astrocitos en el cuerpo estriado 4h



Gráfica 3. Efecto del 3-NP sobre el número de células, en estriado de rata, 4 horas después de su administración.

Cada barra (n=10 campos al azar) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan el número de neuronas y las barras negras el número de astrocitos después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ o $p < 0.05$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

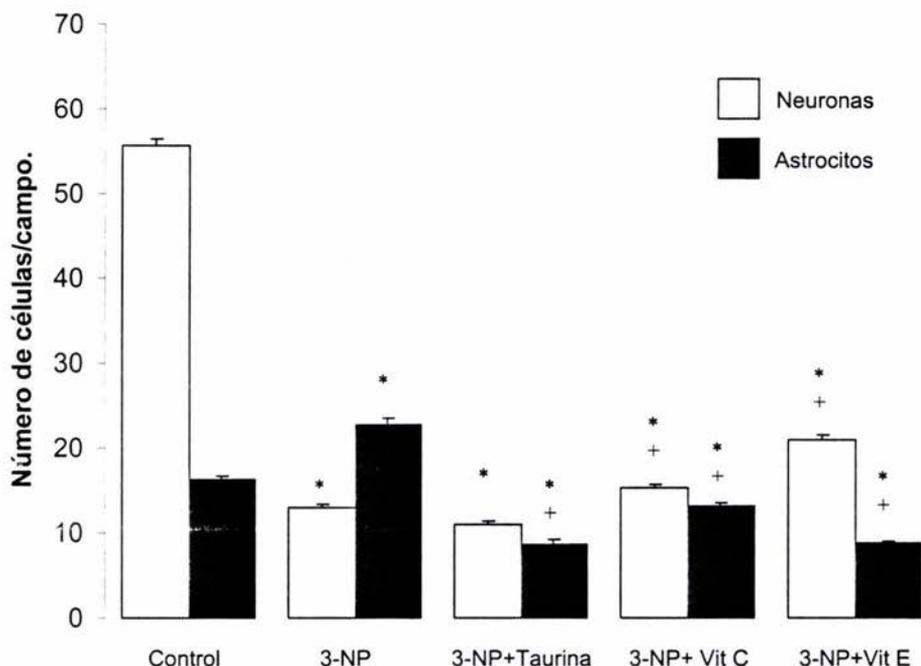
6.4.- Efecto de 3-NP sobre el Número total de neuronas y astrocitos en el cuerpo estriado (8h).

Los resultados muestran una disminución en el número de neuronas totales a las 8 horas en el grupo tratado con 3-NP, así como una disminución en el número de astrocitos y neuronas (excepto en el número de neuronas con el grupo tratado con 3-NP + taurina) en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP y que fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos disminución significativa $P < 0.01$ en el número de neuronas y un aumento significativo en el número de astrocitos ($p < 0.01$). Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) o 3-NP + vitamina E tanto en astrocitos como neuronas ($p < 0.01$) (gráfica 4).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra el grupo que recibió 3-NP + taurina, se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de astrocitos ($p < 0.01$), en el grupo tratado con 3-NP + vitamina C, encontramos un aumento significativo en el número de neuronas y una disminución significativa en el número de astrocitos ($p < 0.01$). El grupo tratado con 3-NP + vitamina E muestra un aumento significativo en el número de neuronas, y una disminución significativa en el número de astrocitos ($p < 0.01$) (gráfica 4).

Número de neuronas y astrocitos en el cuerpo estriado 8h



Gráfica 4. Efecto del 3-NP sobre el número de células, en estriado de rata, 8 horas después de su administración.

Cada barra (n=10 campos al azar) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan el número de neuronas y las barras negras el número de astrocitos después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

6.5.- Descripción Morfológica

Figura 1. Morfología de astrocitos hipocampales (4h).

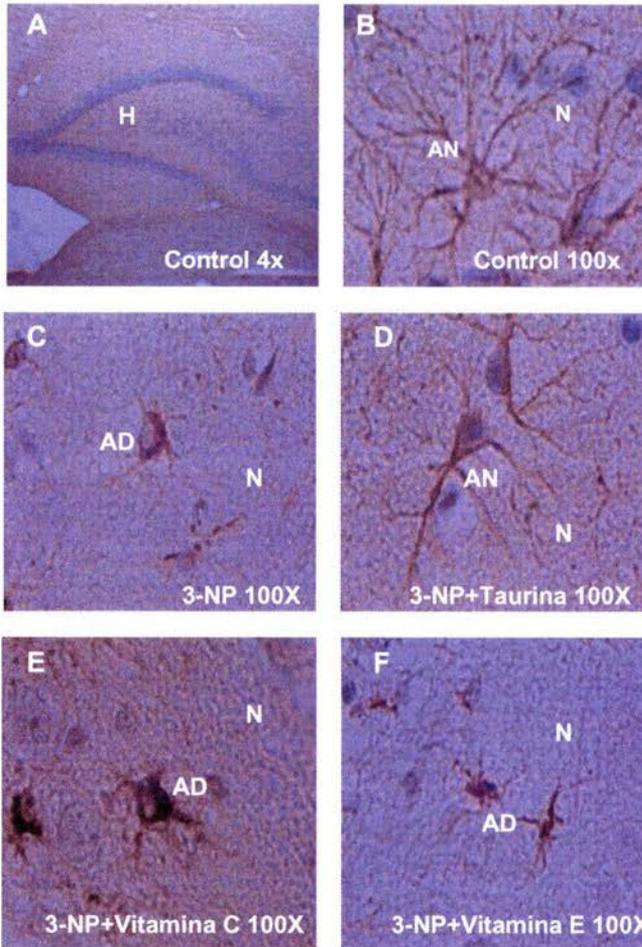


Figura 1. Micrografía de hipocampo de ratas tratadas con A) Control 4X, B) control 100X, C) 3-NP 100X, D) 3-NP + Taurina 100X, E) 3-NP + vit C 100X, F) 3-NP + vit E 100X. Inmuncitoquímica para GFAP (4h). Hipocampo (H), Astrocito normal (AN), Neuropilo normal (N), Astrocito dañado (AD).

Descripción Morfológica de astrocitos hipocampales (4 h).

Los astrocitos de hipocampo a las 4 horas después de la administración de la toxina se encuentran dañados, presentan un engrosamiento del soma y acortamiento de los procesos, aumenta la inmunorreactividad para GFAP, disminuyen de tamaño. Cuando se administra 3-NP + Taurina, los astrocitos se encuentran morfológicamente similares a los controles, mientras que en el grupo tratado con, 3-NP + vit C los astrocitos muestran un engrosamiento y acortamiento de los procesos así como un aumento en la inmunorreactividad. En el grupo de 3-NP + vit E, los astrocitos se encuentran edematizados y presentan acortamiento de los procesos.

Figura 2. Morfología de astrocitos hipocampales (8 h)

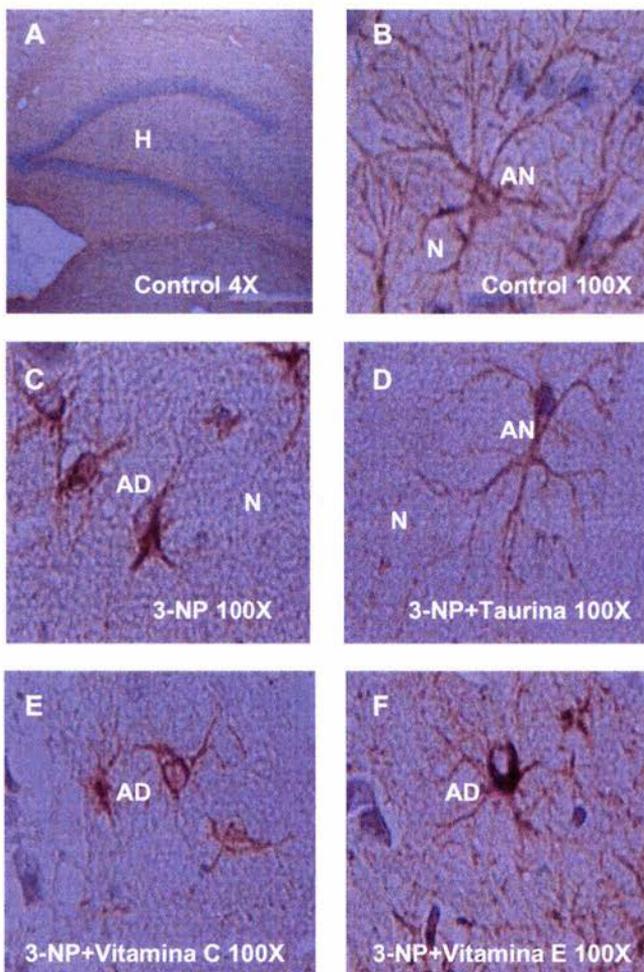


Figura 2. Micrografía de hipocampo de ratas tratadas con A) Control 4X, B) control 100X, C) 3-NP 100X, D) 3-NP + Taurina 100X, E) 3-NP + vit C 100X, F) 3-NP + vit E 100X. Inmuncitoquímica para GFAP (8h). Hipocampo (H), Astrocito normal (AN), Neuropilo normal (N), Astrocito dañado (AD).

Descripción histológica de astrocitos hipocampales (8h).

Los resultados indican que los astrocitos se encuentran edematizados y presentan acortamiento de los procesos en el grupo tratado con 3-NP. En el tratamiento de 3-NP + Taurina, los astrocitos se encuentran morfológicamente similares a los controles, mientras que en los grupos tratados con 3-NP + vit C y 3-NP + vit E, los astrocitos se encuentran edematizados y presentan acortamiento de los procesos.

Figura 3. Morfología de los astrocitos estriatales (4 h).

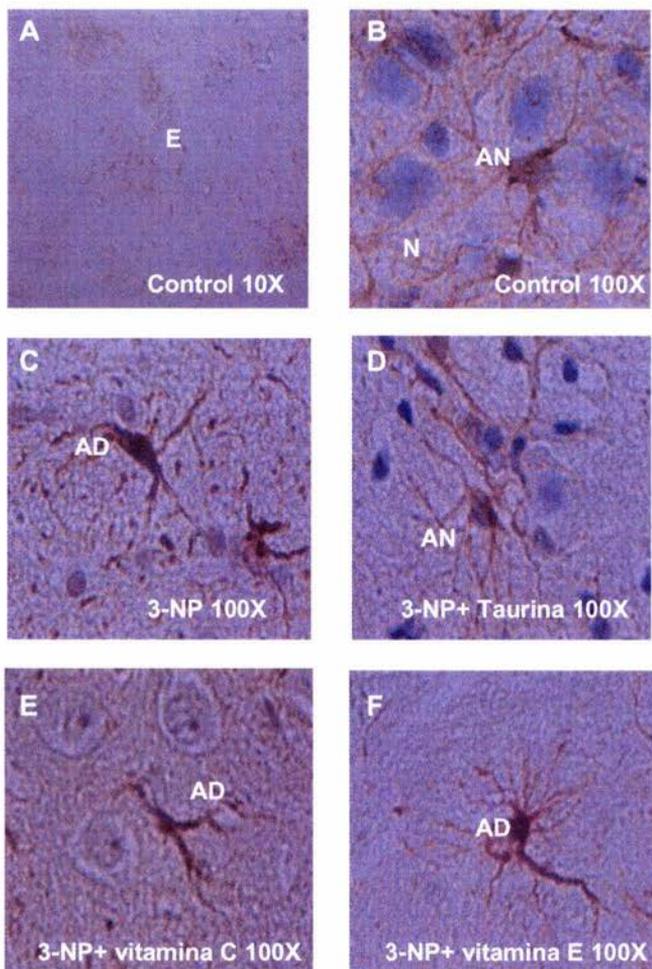


Figura 3. Micrografía de estriado de ratas tratadas con A) Control 4X, B) control 100X, C) 3-NP 100X, D) 3-NP + Taurina 100X, E) 3-NP + vit C 100X, F) 3-NP + vit E 100X. Inmuncitoquímica para GFAP (4h). Estriado (E), Astrocito normal (AN), Neuropilo conservado (N), Astrocito dañado (AD).

Descripción histológica de astrocitos estriatales (4h).

Los astrocitos del cuerpo estriado 4 horas después de la administración de la toxina se encuentran edematizados, presentan engrosamiento del soma y acortamiento de los procesos, aumenta la inmunorreactividad para GFAP y disminuyen de tamaño. En el tratamiento de 3-NP + Taurina, los astrocitos se encuentran morfológicamente similares a los controles, en el grupo tratado con 3-NP + vit C, los astrocitos se encuentran edematizados y presentan atrofia de los procesos y se observa un aumento en la inmunorreactividad, el grupo tratado con 3-NP + vit E 100X los astrocitos se encuentran edematizados.

Figura 4. Morfología de astrocitos estriatales (8 h).

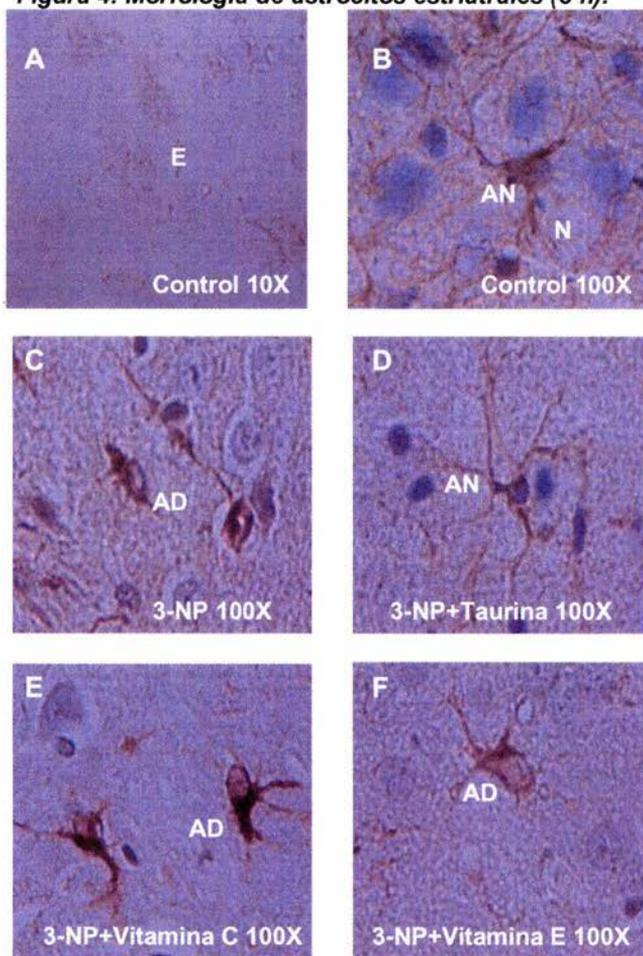


Figura 4. Micrografía de estriado de ratas tratadas con A) Control 4X, B) control 100X, C) 3-NP 100X, D) 3-NP + Taurina 100X, E) 3-NP + vit C 100X, F) 3-NP + vit E 100X. Inmuncitoquímica para GFAP (8h). Estriado (E), Astrocito normal (AN), Neuropilo normal (N), Astrocito dañado (AD).

Descripción histológica de astrocitos estriatales (8h).

Los resultados muestran que los astrocitos se encuentran edematizados en el grupo tratado con 3-NP. En el tratamiento de 3-NP + Taurina, los astrocitos se encuentran morfológicamente similares a los controles, mientras que en el tratado con 3-NP + vit C los astrocitos se encuentran edematizados y presentan atrofia de los procesos y 3-NP + vit E, los astrocitos se encuentran edematizados.

Figura 5. Morfología de neuronas estriatales (4 h).

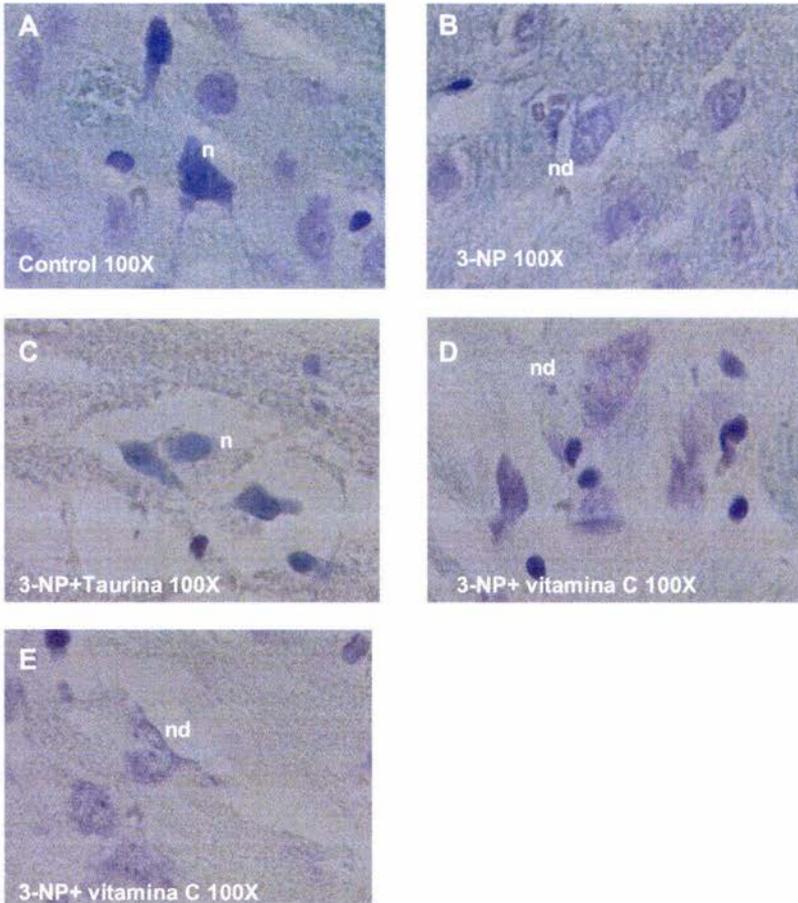


Figura 5. Micrografía de estriado de ratas tratadas con A) Control 100X, B) 3-NP 100X, C) 3-NP + Taurina 100X, D) 3-NP + vit C 100X, E) 3-NP + vit E 100X. Klüver barrera (4h). Neurona control (n), Neuronas dañadas (nd),

Descripción morfológica de neuronas estriatales 4h.

Las neuronas del cuerpo estriado a las 4 horas después del tratamiento con 3-NP, presentan daño celular, con vacuolas en el citoplasma. El grupo tratado con 3-NP + taurina encontramos las neuronas están mejor conservadas que con los otros tratamientos, sin embargo podemos observar un tamaño menor. Las neuronas tratadas con 3-NP + vitamina C muestran edema y daño celular, al igual que el grupo de 3-NP + vitamina E.

Figura 6. Morfología de neuronas estriatales (8 h).

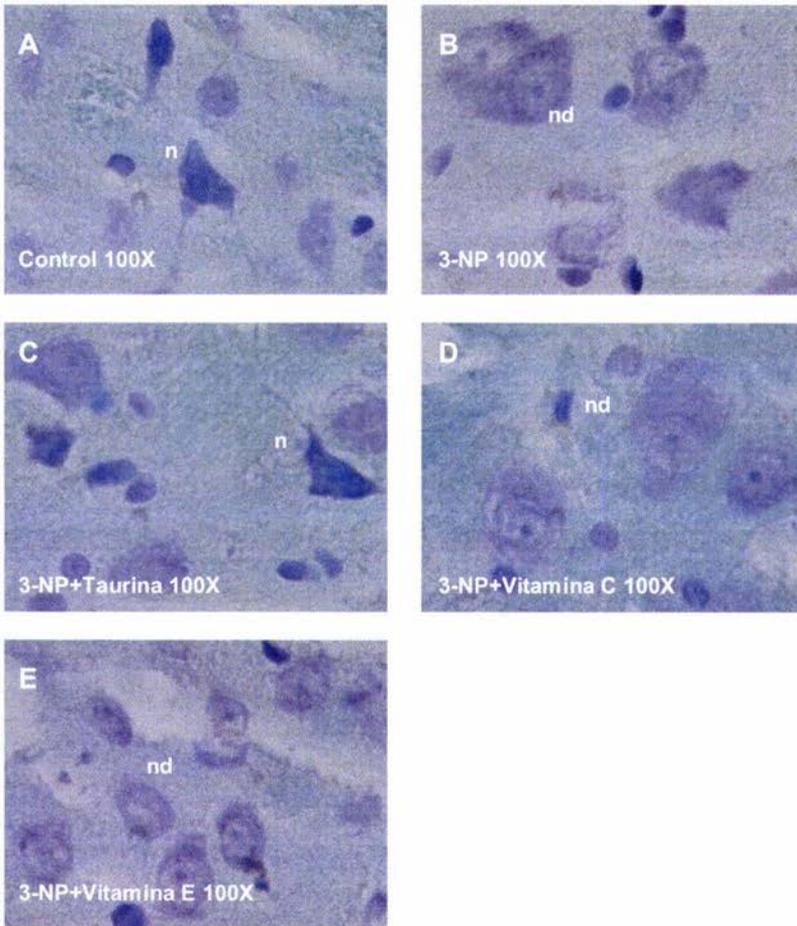


Figura 6. Micrografía de estriado de ratas tratadas con A) Control 100X, B) 3-NP 100X, C) 3-NP + Taurina 100X, D) 3-NP + vit C 100X, E) 3-NP + vit E 100X. Klüver barrera (8h). Neurona control (n), Neuronas dañadas (nd),

Descripción morfológica de neuronas estriatales 8h.

A las 8 horas después de la administración del 3-NP encontramos neuronas con edema celular. En el grupo tratado con taurina se observan neuronas con una morfología normal. Sin embargo tanto en el grupo tratado con vitamina C como en el grupo tratado con vitamina E, las neuronas muestran edema y daño celular.

6.6.- Actividad enzimática de GPx en hipocampo de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Actividad de Gpx 4 horas después de la administración de los fármacos:

Los resultados muestran una disminución a las 4 horas en el grupo tratado con 3-NP, se observa también un aumento en la actividad de la Gpx en el tratamiento con 3-NP + taurina. Los tratamientos con vitamina C y E no muestran cambios con respecto al control.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos diferencias significativas $P < 0.01$. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes solo muestra una diferencia significativa el tratamiento 3-NP + taurina ($p < 0.01$), los tratamientos con 3-NP + vitamina C o 3-NP + vitamina E no muestran cambios significativos (gráfica 5).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes hay un aumento estadísticamente significativa: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 5).

Actividad de Gpx 8 horas después de la administración de los fármacos:

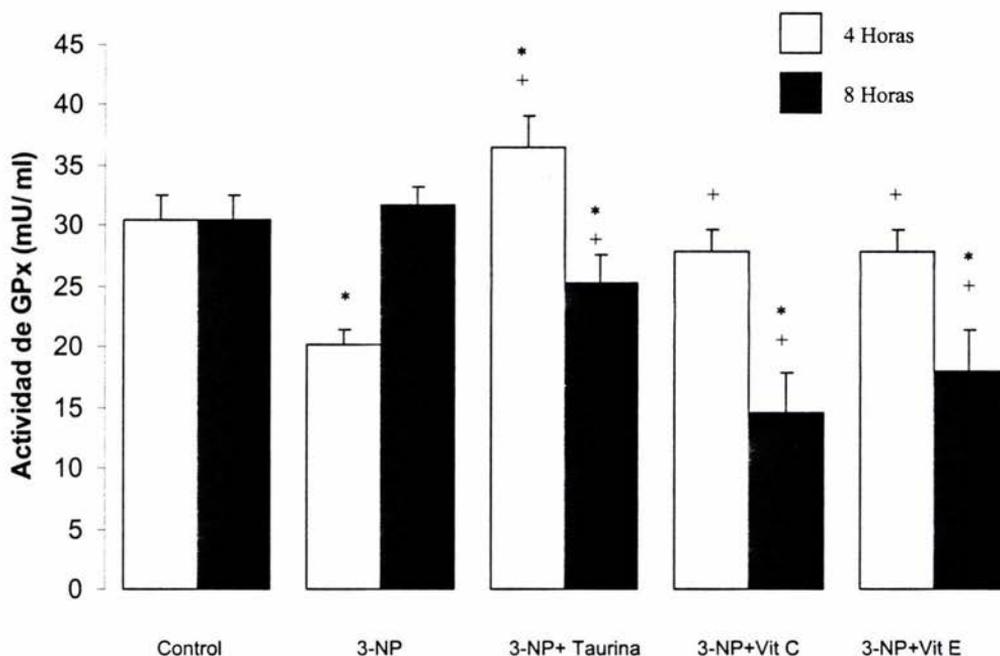
Los resultados no muestran cambios significativos con respecto al control las 8 horas, en el grupo tratado con 3-NP, pero podemos observar una disminución en los niveles de Gpx en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP que fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control no encontramos diferencias significativas. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran una disminución significativa: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 5).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-

NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes hay una disminución estadísticamente significativa: 3-NP + taurina ($p<0.01$), 3-NP + vitamina C ($p<0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p<0.01$) (gráfica 5).

Actividad de la enzima Glutación Peroxidasa en hipocampo



Gráfica 5. Actividad enzimática de GPx en hipocampo de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Cada barra (n= 6) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan la actividad enzimática de GPx a las 4 horas y las barras negras a las 8 horas después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

6.7.- Actividad enzimática de GPx en estriado de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Actividad de GPx 4 horas después de la administración de los fármacos:

Los resultados muestran una disminución en la actividad de GPx en el grupo tratado con 3-NP a las 4 horas, así como una disminución en la actividad enzimática de Gpx, en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos diferencias significativas $P < 0.01$. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 6).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes no se observa una disminución estadísticamente significativa en los grupos tratados con 3-NP + taurina y 3-NP + vitamina E, el grupo tratado con 3-NP + vitamina C se observa una disminución significativa ($p < 0.01$) (gráfica 6).

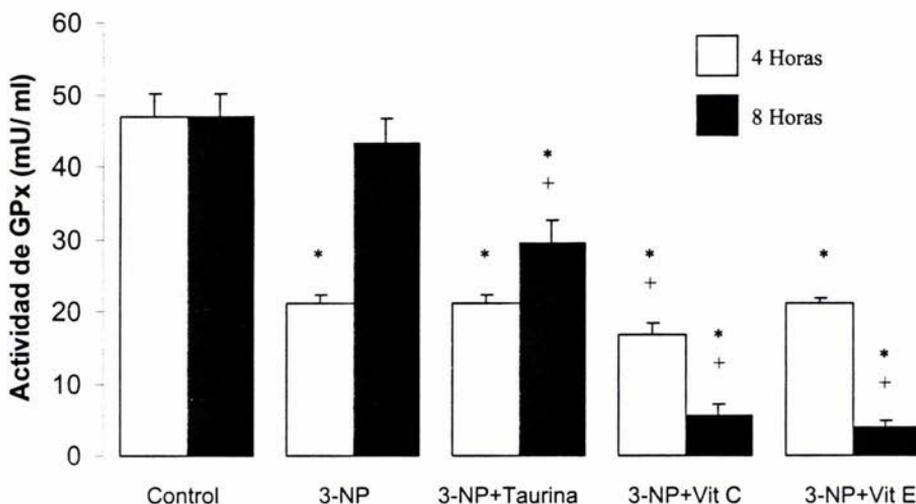
Actividad de GPx 8 horas después de la administración de los fármacos:

Los resultados no muestran cambios la actividad de la GPx a las 8 horas en el grupo tratado con 3-NP, pero si una disminución en la actividad de Gpx en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP no muestra diferencias significativas con respecto al grupo control. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes muestran diferencias significativas: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 6).

Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes hay una disminución estadísticamente significativa: 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p < 0.01$) (gráfica 6).

Actividad de la enzima Glutación Peroxidasa en estriado



Gráfica 6. Actividad enzimática de GPx en estriado de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Cada barra ($n=6$) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan la actividad enzimática de Gpx a las 4 horas y las barras negras a las 8 horas después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p<0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p<0.01$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

6.8.- Actividad enzimática de SOD en hipocampo de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Actividad de SOD 4 horas después de la administración de los fármacos:

Los resultados muestran un aumento en la actividad de la SOD a las 4 horas en el grupo tratado con 3-NP. El tratamiento con 3-NP + taurina, muestra una disminución con respecto al control. Los tratamientos con vitamina C y E muestran un aumento con respecto al control.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control encontramos diferencias significativas en la actividad de la SOD ($P < 0.01$). Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes, podemos observar cambios significativos en la actividad de la SOD ($p < 0.01$) (gráfica 7).

La prueba de Dunett muestra que el grupo que solo recibió 3-NP, al ser comparado con el grupo que recibió 3-NP + taurina presenta una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la SOD ($p < 0.01$), los grupos tratados con 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E presentan un aumento significativo en la actividad de las SOD al compararse contra el grupo con 3-NP ($p < 0.01$) (gráfica 7).

Actividad de SOD 8 horas después de la administración de los fármacos:

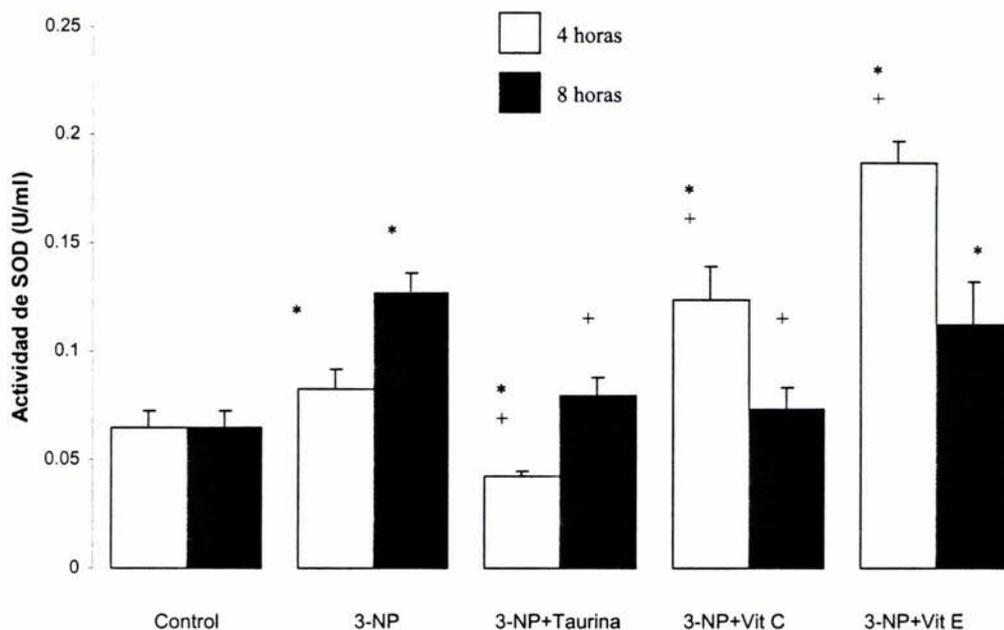
Los resultados muestran cambios con respecto al control a las 8 horas, tanto en el grupo tratado con 3-NP como en los grupos tratados con 3-NP y antioxidantes. Podemos observar una disminución en la actividad de SOD el grupo que después de la inyección del 3-NP que fueron tratados con taurina, en los grupos que recibieron 3-NP + vitamina C y E se observa un aumento en la actividad de la SOD.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control, encontramos un aumento significativo ($p < 0.01$) en la actividad de la SOD. Los

grupos tratados con 3-NP + taurina y 3-NP + vitamina C, no muestra cambios significativos en la actividad de las SOD, al ser comparados contra el control (gráfica 7). Cuando se compara el grupo control contra el grupo que recibió 3-NP + vitamina E encontramos un aumento significativo ($p < 0.01$) en la actividad de la SOD.

Al comparar con la prueba de Dunett, el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP + taurina y 3-NP + vitamina C encontramos una disminución significativa ($p < 0.01$) en la actividad de SOD. El grupo tratado con 3-NP + vitamina E no muestra cambios significativos en la actividad de la SOD con respecto al 3-NP (gráfica 7).

Actividad enzimática de SOD en hipocampo de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.



Gráfica 7. Actividad enzimática de SOD en hipocampo de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Cada barra (n= 6) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan la actividad enzimática de SOD a las 4 horas y las barras negras a las 8 horas después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

6.9.- Actividad enzimática de SOD en estriado de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Actividad de SOD 4 horas después de la administración de los fármacos:

Los resultados no muestran cambios a las 4 horas en el grupo tratado con 3-NP, sin embargo si se observa una disminución en la actividad de la SOD en los tratamientos con: 3-NP + taurina, 3-NP + vitamina C y 3-NP + vitamina E con respecto al control.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.01$. Cuando se compara con la prueba de Dunett, el grupo que recibió 3-NP, con respecto al grupo control no muestra diferencias significativas. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP y que además fueron tratados con los antioxidantes (excepto el grupo tratado con 3-NP + vitamina E), muestran una disminución significativa en la actividad de la SOD ($p < 0.01$) (gráfica 8).

Al comparar con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP + taurina y 3-NP + vitamina C se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la SOD ($p < 0.01$). El grupo tratado con 3-NP + vitamina E no muestra cambios significativos en la actividad de la SOD, cuando se compara con el grupo tratado con 3-NP (gráfica 8).

Actividad de SOD 8 horas después de la administración de los fármacos:

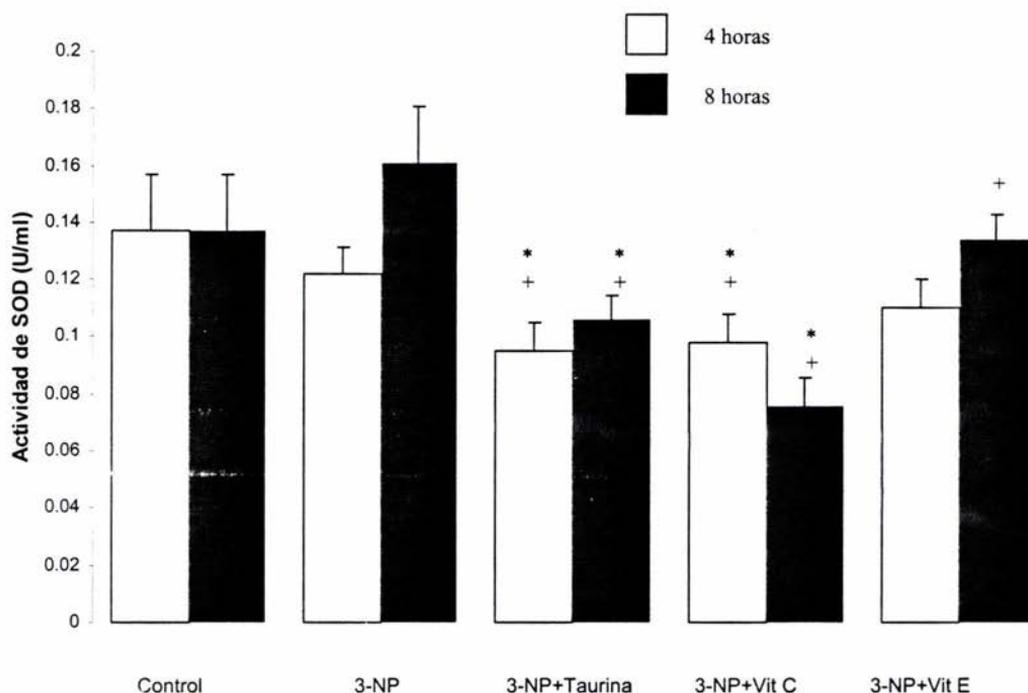
Los resultados no muestran cambios con respecto al control a las 8 horas, en el grupo tratado con 3-NP. En los grupos tratados con 3-NP y antioxidantes, podemos observar una disminución en los niveles de SOD en todos los grupos que después de la inyección del 3-NP que fueron tratados con antioxidantes.

Al analizar estadísticamente los grupos, con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$. Cuando se compara con la prueba de Dunett el grupo que recibió 3-NP con respecto al grupo control, este no mostró diferencias significativas. Cuando se compara el grupo control contra los grupos que recibieron 3-NP + taurina y 3-NP + vitamina C muestran una disminución significativa en la actividad de la SOD ($p < 0.01$).

El grupo tratado con 3-NP + vitamina E no muestra cambios con respecto al control (gráfica 10).

Al comparar con la prueba de Dunett el grupo que solo recibió 3-NP contra los grupos que recibieron 3-NP + taurina ($p < 0.01$), 3-NP + vitamina C ($p < 0.01$) y 3-NP + vitamina E ($p < 0.05$) presentan una disminución estadísticamente significativa en la actividad de SOD, en los todos los grupos tratados con antioxidantes (gráfica 8).

Actividad enzimática de SOD en estriado de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.



Gráfica 8. Actividad enzimática de SOD en estriado de rata a las 4 y 8 horas después de la administración de los fármacos.

Cada barra (n= 6) representa la media \pm E.E. Las barras blancas representan la actividad enzimática de SOD a las 4 horas y las barras negras a las 8 horas después de aplicado los tratamientos. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ entre el grupo control y los grupos experimentales y los signos de más representan las diferencias estadísticas a una $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente, entre el grupo 3-NP y los grupos experimentales (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunett).

7.- *Discusión*

La disminución en el metabolismo energético y el estrés oxidativo pueden jugar un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas. Nuestros resultados muestran un incremento en los niveles de peroxidación de lípidos tanto en estriado como en hipocampo con el tratamiento de 3-NP, lo cual indica que al menos una parte del daño producido, está mediado por el estrés oxidativo (Gráficas 1 y 2). Estos datos coinciden con estudios en los cuales se implica la participación del estrés oxidativo como parte de la neurotoxicidad inducida por el 3-NP (Nishino et al., 1997). En este estudio, los tratamientos con antioxidantes: taurina, vitamina C y vitamina E contrarrestan el incremento en la lipoperoxidación, actuando como atrapadores de radicales libres, pero no aminoran las alteraciones morfológicas producidas por el 3-NP (Figura 1C, E y F, figura 2C, E y F, figura 3C, E y F, figura 4C, E y F, Figura 5 B, D y E, Figura 6B, D y E), a excepción de los grupos tratados con: taurina (1D, 2D, 3D, 4D, 5C y 6C)

Los astrocitos son unos de los principales blancos del 3-NP, cuyas alteraciones producidas por esta toxina comienzan con edema (Alexi et al., 1998). En este trabajo, encontramos daño astrocítico en estriado e hipocampo a las 4 y 8 horas después de la administración del 3-NP como lo muestran las figuras 1C y 2C. Los astrocitos pierden la capacidad para mantener su homeostasis, lo que produce una entrada masiva de agua, la cual lleva a un aumento en el edema celular con pérdida de la morfología normal (Kreutzberg et al., 1989). En este estudio, también encontramos en el cuerpo estriado, edema neuronal tanto a las cuatro como a las ocho horas después de la administración del 3-NP (Figura 5B y

6B respectivamente). La taurina a las cuatro horas muestra un aspecto morfológico similar a las neuronas del grupo control, sin embargo el tamaño de las neuronas disminuye (Figura 5C). A las ocho horas después del tratamiento con 3-NP + taurina, las neuronas presentan un aspecto muy similar a las neuronas del grupo control (Figura 6C). Los grupos tratados con 3-NP + vitamina C y 3-NP + vitamina E, no son capaces de contrarrestar el daño morfológico producido por el 3-NP, ya que en las neuronas se observan vacuolas y edema celular. Lo cual indica que la taurina es el único antioxidante capaz de mantener la morfología neuronal a las ocho horas después de la administración de la toxina, ya que probablemente la célula necesita más tiempo para recuperarse del daño producido por el 3-NP.

El edema celular es uno de los cambios más comunes de daño celular en sistema nervioso. El ácido 3-NP inhibe al complejo II de la cadena respiratoria en la mitocondria, lo cual produce un déficit energético que implica el mal funcionamiento de las bombas de sodio/potasio que conlleva al edema celular (Chang, 1993).

La integridad morfológica solo se observó en astrocitos hipocampales cuando la taurina fue administrada a los animales tratados con 3-NP (Figura 1D). Los tratamientos con vitamina C y vitamina E no fueron efectivos para prevenir el daño morfológico de los astrocitos inducido por el 3-NP. Sin embargo, a pesar que todos los tratamientos utilizados en este trabajo, presentan un efecto antioxidante disminuyendo la peroxidación de lípidos, no presentan igual efecto protector contra la muerte celular (Gráfica 3), tampoco conservan la morfología de las células que sobreviven. Probablemente se debe al nivel donde actúa cada uno de los

antioxidantes, por ejemplo la vitamina C se encuentra en citoplasma y se encarga de atrapar a los RL que se encuentran en el (Bendich et al., 1986). Por otro lado la vitamina E se encuentra en las membranas, donde ejerce su efecto antioxidante, en este caso, la inyección de 3-NP produce una inhibición en la producción de ATP, lo que conduce a un estado de estrés oxidativo secundario a un déficit energético. El sitio de acción de los antioxidantes podría ser de vital importancia para contrarrestar a los RL producidos por esta toxina y el posible efecto protector podría depender de la causa que inicie el estrés oxidativo.

Por otro lado la taurina es la única que tiene un efecto importante, al preservar la morfología de las células que sobreviven (Figuras 1 a 6). Este hecho puede deberse a que este aminoácido participa en mecanismos de osmorregulación (Pasantes-Morales y Schouboe., 1998). En este estudio el bloqueo energético producido por el 3-NP altera los mecanismos de osmorregulación permitiendo la entrada masiva de agua, este efecto puede ser contrarrestado por la taurina. Este aminoácido es liberado durante el daño celular y actúa previniendo el rápido flujo de sodio y agua, manteniendo el equilibrio osmótico y disminuyendo el edema celular. Otra importante función de la taurina es la modulación de calcio, y aún cuando los mecanismo por medio de los cuales actúa, no se conocen, de alguna manera permiten darle una mayor protección a las células. Cuando se forma el poro de transición en la mitocondria, se causa una disminución en la producción de ATP que puede llevar a la célula a la muerte por falla energética, incrementando el estrés oxidativo. La modulación de calcio podría explicar por qué la taurina ejerce una mayor protección en las células que sobreviven a diferencia de la vitamina C y E.

Aunado a lo anterior, los antioxidantes endógenos como la enzima glutatión peroxidasa (GPx) juegan un papel muy importante en la eliminación de peróxidos y por lo tanto en la defensa intracelular para mantener el equilibrio en los procesos de oxido-reducción. (Siesjö et al., 1989; Binienda et al., 1998). Nuestros resultados muestran una disminución en la actividad de la GPx en hipocampo (Gráfica 5) y estriado (Gráfica 6) a las 4 horas. Otros autores también muestran una disminución dos horas después de la administración del 3-NP (Binienda et al., 1998). Los resultados muestran que el 3-NP produce una disminución en la actividad de GPx estriatal a las 4 horas (Gráfica 6), lo cual no se manifiesta a las 8 horas, en los grupos tratados con antioxidantes la actividad disminuye en ambos tiempos. Cuando aumenta la concentración de peróxidos en la célula, la GPx se bloquea disminuyendo su actividad, los mecanismos por los cuales sucede esto aún no se conocen, además como se menciona anteriormente, los RL libres oxidan proteínas, por lo cual las enzimas son también blancos de los RL, produciendo alteraciones en estos sistemas.

La GPx se encuentra ampliamente distribuida en el citoplasma celular, en la mitocondria esta enzima se encuentra en menor proporción y podría asociarse a mecanismos de defensa antiapoptótica, mediada por daño mitocondrial producido por peróxidos y por el radical hidroxilo (OH) (Borlogan, 1996). Se sabe que la mitocondria produce la mayor cantidad de ROS, ya que el bloqueo selectivo de algún componente del complejo de la cadena respiratoria genera la formación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno, capaces ambos de atacar membranas mitocondriales, así como combinarse con otro tipo de radicales libres para formar especies mucho más tóxicas, como el radical hidroxilo o el radical peroxinitrito. Por

otro lado, cerca del 2-5% del superóxido utilizado en la mitocondria es transformado por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn), a peróxido de hidrógeno y la GPx es la única capaz de reducir al peróxido de hidrógeno producido por la SOD-Mn en la mitocondria.

Por lo tanto, una disminución en la actividad de GPx está indicando, en este experimento, una pérdida de la capacidad tanto de la célula como de la mitocondria para hacer frente a la excesiva producción de peróxido de hidrógeno por el aumento de radicales libres, lo cual evita mantener el balance redox necesario para el buen funcionamiento celular. Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad de la SOD, en el grupo tratado con 3-NP a las 4 horas después de la administración del fármaco (Gráfica 7). Este aumento en la actividad de la SOD contribuye de manera importante al incremento de peróxidos en la célula, los cuales pueden inhibir directamente a la GPx, produciendo una disminución en la actividad de dicha enzima.

La superóxido dismutasa (SOD) es considerada otro de los mecanismos de defensa antioxidante importantes para la protección celular. La SOD en células de mamíferos, presenta dos isoformas, una que se encuentra primordialmente en citoplasma, y es denominada SOD dependiente de Cu/Zn (SOD-Cu/Zn) (Fridovich, 1978), mientras que en la matriz mitocondrial se localiza a la SOD dependiente de Mn (SOD-Mn) (Weisiger y Fridovich., 1973; Matsuda et al., 1990; Marklund, 1978; McCord et al., 1977). Ambas isoformas reducen las concentraciones del radical superóxido, previniendo de esta manera el daño celular (Binienda et al., 1998). Para el caso del hipocampo, tanto a las 4 como a las 8 horas los tratamientos con 3-NP producen un aumento en la actividad enzimática de la SOD total, dejando de

manifiesto, la implicación del estrés oxidativo producido por el uso de este modelo (Gráfica 7). En estriado no se observan cambios en la actividad enzimática de la SOD total (Gráfica 8), no conocemos la causa y probablemente otros antioxidantes endógenos como el sistema de glutatión estén actuando, permitiendo al sistema recuperarse. La inyección intraestriatal de 3-NP produce cambios en la actividad de la SOD (Santamaría et al., 2001). Un incremento de la SOD-CuZn atenúa la fragmentación del DNA y el volumen de lesión estriatal después del tratamiento con 3-NP en ratones deficientes de SOD-Mn (Kim y Chang., 2002).

También se ha reportado una disminución en la actividad de Mn-SOD en neuronas corticales como resultado de la toxicidad del glutamato (Li et al., 1998). Asimismo se ha demostrado que la sobre-expresión de SOD-CuZn reducen la producción de el radical superóxido y disminuyen el daño hipocampal (CA1) después de una isquemia global (Sugawara et al., 2002). Por lo que el radical superóxido juega un papel muy importante, en el daño celular. La ingesta accidental de 3-NP, produce alteraciones tanto clínicas (nauseas, vómito, encefalopatías, coma y en los pacientes que sobreviven, movimientos coreiformes y distonia) como bioquímicas (muerte de neuronas GABAérgicas y colinérgicas así como disminución de GABA y acetil-colina, entre otras) (Ludolph et al., 1991). Todo lo anterior indica que el daño mitocondrial (déficit energético) induce severas alteraciones tanto en neuronas como en glia. Existen algunas enfermedades neurodegenerativas, que se manifiestan, una vez que el número de células ha disminuido. En nuestros experimentos, la taurina protegió morfológica y probablemente funcionalmente a las células que sobreviven, lo cual es de vital importancia en este tipo de patologías donde la manifestación y gravedad de la

enfermedad depende de la correcta funcionalidad y preservación de la células que aún sobreviven.

8.- Conclusiones

- 1) La administración de 3-NP produce estrés oxidativo.
- 2) Todos los tratamientos estudiados presentaron efecto antioxidante ya que previenen el incremento en los niveles de la peroxidación de lípidos causados por la administración de 3-NP.
- 3) Ninguno de los tratamientos protege de la muerte celular causada por la administración de 3-NP.
- 4) La actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas (GPx y SOD), presentan diferencias entre el cuerpo estriado y el hipocampo.
- 5) La taurina es el único antioxidante que preserva la morfología en las células que sobreviven.
- 6) El número de células disminuye en los distintos tratamientos, lo que indica que el efecto antioxidante es diferente del efecto protector de la muerte celular, ya que una vez que se desencadenan otros mecanismos intracelulares (aumento de calcio intracelular, activación de caspasas involucrando la salida del citocromo C de la mitocondria, procesos de inflamación, entre otros), conducen a la muerte ya sea necrótica o apoptótica de la célula.

9.- Literatura citada

- Abdeslem El., Idrissi y Ekkhart T. (1999). Growth Factors and Taurine Protect against Excitotoxicity by Stabilizing Calcium Homeostasis and Energy Metabolism. *The J. Neuroscience*. 19(21): 9459-9468.
- Alexi T., Hughes P E., Faull R L M y Williams C E. (1998). 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport*. 9(11): R57-R64.
- Alston T., Mela L y Brig, HJ. (1977). 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:3767-3771.
- Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S y Wendl A. (1997). Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease: an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56(4): 440-454.
- Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Kowall N. W., Miller J. M., Storey E., Srivastava R., Rosen B. R., & Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci*, 13, 4181-4192.
- Beal M. F. (2000). Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, 23(7), 298-304.
- Bender DA. (1992). Vitamine E: tocopherols and tocotrienols. En: Nutritional Biochemistry of the vitamins. *Cambridge: Cambridge University Press*. Cap 4:87-105.

- Bendich LJ., Machlin O., Scandurra GW., y Burton DD. (1986). *Free Radical Biology & Medicine*. 2: 419-444.
- Ben-Shachar D, Zuk R, Glinka Y. (1995). Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem* 64: 718-723.
- Bieri JB., Corash L., y Hubbard. (1983). Medical use of vitamine E. *N Eng J Med*. 308 (18):1063-71.
- Binienda Z., Simmons C., Hussain S., Slikker W Jr y Ali SF. (1998). Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain. *Neurosci. Lett* 251:173-176.
- Bjornebue A., Jun EA y Devron CA. (1990). Absorption, transport and distribution of vitamine E. *J Nutr*. 120(3):233-42.
- Brouillet EP, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW. (1993). Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurochem*. 60: 356-359.
- Brouillet E., Condé F., Beal M. F., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*. 59, 427-468.
- Browne, S E; Bowling, A C; MacGarvey, U; Baik, M J; Berger, S C; Muqit, M M; Bird, E D; Beal, M F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals Of Neurology*. 41(5): 646-653.

- Borlongan CV., Koutouzis TR., Freedman TB. (1995). Behavioral pathology induced by repeated systemic injection of 3-nitropropionic acid mimics the mitotic symptoms of Huntington's disease. *Brain Res.* 697: 251-257.
- Browery NG., Hill y Hudson, AL. (1983). Characteristics of GABA B receptors binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br J Pharmacol* 78: 191-206.
- Bureau MH, and Olsen RW. (1991). Taurine acts on a subclass of GABA_A receptors in mammalian brain in vitro. *Eur J Pharmacol.* 207: 9-16.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. (1996). The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. 19(1):19-24.
- Chan AC. (1993). Partners in defense, vitamine E and vitamine C. *Can J Physiol Pharmacol.* 71(9):725-31.
- Chang WL. (1993). Introduction to basic principles of neurocytology and general concepts on neuropathology. In: *principles of neurotoxicology*. Louis. W. Chang. Ed. Marcel Dekker. Inc. New York. 88p.
- Chesney RW., Gusowski N y Dabbagh S. (1987). Studies on renal adaptati3n to altered dietary amino acid intake: reduced renal taurine cortex content increased the Vmax of taurine uptake by brush border membrane vesicles. *Pediatr. Nephrol.* 1:9-15.
- Choi D. W. (1990). Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* 10:2493-2501.
- Chow CK. (1985). Vitamine E and blood. *World Rev Nutr Diet.* 45:133-66.

- Contro P y Oja S. (1990). Interactions of taurine with GABA B binding sites in mouse brain. *Neuropharmacology*. 29: 243-247.
- Coles CJ., Edmondson DE y Singer TP. (1979). Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-Nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 254: 5161-5167.
- Coyle JT y Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 262:689-695.
- Dawson R, Jr., Eppler B., Patterson TA., Shih D y Liu, S. (1996). The effects of taurine in a rodent model of aging. In "Taurine" (R. J. Huxtable et al., Eds) vol. 2, pp 445-454. Plenum, New York/London
- Duell PB. (1996). Prevention of atherosclerosis with dietary and antioxidants: fact or fiction. *Journal of nutrition*. 126: 1067S-1071S.
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, Bockaert J. (1988). A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol*. 34(6): 880-887.
- Dure LS, Young AB, Penney JB. (1991). Excitatory amino acid binding sites in the caudate nucleus and frontal cortex of Huntington's disease. *Ann Neurol*. 30:785-793.
- Dutton GR., Barry M and Philbert RA. (1991). Astrocyte taurine. *Ann N Y Acad Sci*. 633: 489-500.
- Fink S L., Ho D Y., Sapolsky R M. (1996). Energy and glutamate dependency of 3-nitropropionic acid neurotoxicity in culture. *Exp. Neurol*. 138, 298-304.

- Fu Y., He F., Zhang S., Huang J., Zhang J., Jiao X. (1995). 3-Nitropropionic acid produces indirect excitotoxic damage to rat striatum. *Neurotoxicol. Teratol*, 17:333-339.
- Fitzmaurice PS, Ang L, Guttman M, Rajput AH, Furukawa Y, Kish SJ. (2003) Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord*. 18(9):969-76.
- Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Halliwell Barry y Gutteridge John M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publication 3^a ed.
- Geddes JW, Bondada V and Pang Z. (2000). Mechanism of 3-nitropropionic acid neurotoxicity: Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders. Human Press Totowa, New Jersey. 107-120.
- Globus Y-T, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. (1988). Effect of ischemia on the *in vivo* release of striatal dopamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*. 51: 1455-1464.
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper Jm, Schapira AHV. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol*. 39: 385-389
- Hayes KC., Carey RE y Schmidt, SY. (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science*. 188:949-951.
- Huxtable RJ. (1992). The physiological actions of taurine. *Physiol. Rev*. 72: 101-163.

- Huxtable RJ. (1989). Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol.* 32: 471-533.
- Jenner P, Olanow C. W. (1998). Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44(3):S72-84.
- Kim G W., Copin J C., Kawase M., Chen S F., Sato S., Gobbel G T y Chang P H. (2000). Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20: 119-129.
- Kim G W y Chang P H. (2001). Oxidative Stress and Neuronal DNA Fragmentation Mediate Age-Dependent Vulnerability to the Mitochondrial Toxin, 3-Nitropropionic Acid, in the Mouse Striatum. *Neurobiology of disease.* 8: 114-126.
- Kim G W y Chang PH. (2002). Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22(7): 798-89.
- Kitts DD. (1997). An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food Science and technology.* 8:198-203.
- Koutouzis TK, Borlogan CV, Scordia T, Creese Y, Cahill DW, Freeman TB. (1994). Systemic 3-nitropropionic acid: Long-term effects on locomotor behavior. *Brain Res.* 646: 242-246.

- Koroshetz W J., Jenkins B G., Beal M F., Rosen B R. (1992). Localized proton-NMR spectroscopy in patients with Huntington's disease (HD) demonstrates abnormal lactate levels in occipital cortex: evidence for compromised metabolism in HD. *Neurology* 42: 319.
- Kreutzberg G., Graeber M y Streit, W. (1989). Neuron-Glia Relationship During Regeneration of Motoneurons. *Metabolic Brain Disease*. 41), 81-85.
- Kruman I I and Mattson M P. (1999). Pivotal Role of Mitochondrial Calcium Uptake Neuronal Cell Apoptosis and necrosis. *J of Neurochemistry*. 529-540.
- Lee W T., Yin H S and Shen Z. (2002). The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N- Methyl- D- Aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. *Neuroscience*. 112(3): 707-716.
- Li H., Shen XM y Dryhurst G. (1998). Brain mitochondrial catalyse the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT6) to intermediate that irreversibly inhibit complex I and scavenger glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 71: 2049-2062.
- London ED, Yamamura HI, Bird ED, Coyle JT. (1981). Decreased receptor-binding sites for kainic acid brains of patients with Huntington's disease. *Biol Psychian*. 16: 155-162.
- Ludolph AC., He F., Spencer PS., Hmmerstad J y Sabri M. (1991). 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci* 18:492-498.

- MarKlund S. (1978). Purification and characterization of manganese containing superoxide dismutasa from bovine heart mitochondria. *Int. J. Biochem.* 9:299-306.
- McCord JM., Boyle J., Day E., Rizzola LJ y Salin MLA. (1977). Manganese containing superoxide dismutasa from dismutasa from human liver. In superoxide dismutase (A M Michelson., H M McCord and I Fridovich. Eds) 129-138. Condon Press.
- Mcgeer E G y Mcgeer P L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic acid and kainic acid. *Nature.* 263: 517-519.
- Matsuda Y., Higashiyama S., Kijima Y., Suanki K., Kawano K., Akiyama M., Kawata S., Tauri S., Deutsch H y Tanguchi N. (1190). Human liver manganese superoxide dismutasa: Purification and crystallization, subunit association and sulphhydryl reactivity. *Eur. J. Biochem.* 194:713-70.
- Mecocci P., MacGarvey U., Beal M. F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 36: 747-751.
- Moser U y Weber F. (1983). *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 54: 47-53.
- Nars P., Gursahani H I., Pang Z., Bondada V., Lee J., Hadley R W., Geddes J W. (2003). Influence of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3nitropropionic acid. *Neurochemistry Int.* 43:89-99.
- Nishino H., Shimano, Y y Kumazaki M. (1995). Chonically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions atributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosc. Lett.* 186: 161-164.

- Nishino H., Kumazaki M., Fukuda A., Fujimoto I., Shimano Y., Hida H., Sakurai T., Deshpande SB., Simizu H., Morikawa S y Inubushi T. (1997). Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neuroscience Research*. 27, 343-355.
- Novelli A., Reilly A J., Lysko, P G., Henneberry, R C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res*. 451, 205-212.
- Palfi S., Ferrante R J., Broulliet E., Beal F., Dolan R., Guyot M C., Peschanski M and Hantraye P. (1996). Chronic 3-Nitropropionic Acid Treatment in Baboons Replicates the Cognitive and Motor Deficits of Huntington's disease. *J. of Neuroscience*. 16(9): 3019-3025.
- Pang Z and Geddes W. J. (1997). Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. of Neuroscience*. 17(9): 3064-3073.
- Pasantes-Morales H y Schousboe A. (1998). Volume regulation in astrocytes: A role for taurine as an osmoreffector. *J Neuroci. Res*. 20(4): 503-509.
- Rebekah J. Jakel and William F. Maragos. (2000). Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends in Neurosciences* (23), 6: 239-245 .
- Redburn DAR y Schousboe A. Eds. (1987). Neurotrophic Activity of GABA during Development. pp 1-277, *New York: Alan R. Liss*.

- Rivas-Arancibia S., Dorado-Martínez C., Borgonio-Pérez G., Hiriart-Urdanivia M., Verdugo-Díaz L, Durán-Vázquez A, Colin-Baranque L y Avila-Costa MR. (1999). Effects of Taurine on Ozone-Induced Memory Deficits and Lipid Peroxidation Levels in Brains of Young, Mature, and Old Rats. *Environmental Research*, 81.
- Rivas-Arancibia S., Rodríguez A.I., Zigova T., Willing A.E., Brown W.D., Cahill D.W., Samberg P.R. (2000). Taurine increases rat survival and reduces striatal damage caused by 3-nitropropionic acid. *Intern. J. Neuroscience*. 1-13.
- Santamaría A., Perez-Severiano F., Rodríguez-Martínez E., Maldonado DP., Pedraza-Cheverri J., Ríos C y Segovia J. (2001). Comparative análisis of superoxide dismutase activity between acute pharmacological models and a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochemical Research* 6(4):419-424.
- Sato S., Gobbel GT y Honkaniemi J. (1997). Apoptosis in the striatum of rats following intraperitoneal injection of nitropropionic acid. *Brain Res*. 745: 343-347.
- Schaffer S. W y Azuma J. (1992). Myocardial physiological effects of taurine and their significance. In *Taurine: Nutritional Value and Mechanisms of action* (Edited by Lombardini J. B., Schaffer S. W. And Azuma, J). pp 105-120. *Plenum Press, New York*.
- Sian, J; Dexter, D T; Lees, A J; Daniel, S; Agid, Y; Javoy-Agid, F; Jenner, P; Marsden, C D. (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals Of Neurology* (36)3: 348-355.

- Siesjö B, K., Agardh C, D., Bengtsson, F. (1989). Free radicals and brain damage, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev*, 1:165-211.
- Smith K.E., Borden LA., Wang CHD., Harting PR., Branchek TA., Weinshank RL. (1992). Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain *Molecular Pharmacol.* 42: 563-569.
- Schulz JB., Henshaw DR y Swek D. (1995). Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J.Neurochem.* 64:2239-2247.
- Shain W y Martin DL. (1990). Uptake and release of taurine an overview. In taurine: Funcional neurochemistry, physiology, and cardiology, Pasantes-Morales H, Shain W, Martin DL, Martin de Río R (eds), *Wiley-Liss Inc, New York.* 243-252.
- Sugawara T., Nobuo N., Lewén A., Gasche Y., Ferrand-Drake M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y y Chan P H. (2002). Overexpression of Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Transgenic Rats Protects Vulnerable Neurons against Ischemic Damage by Blocking the mitochondrial Pathway of Caspase Activation. *Journal of neuroscience.* 22(1):202.
- Timbrell JA., Seabra V y Waterfield CJ. (1995). The in vivo an in vitro protective properties of taurine. *Gen. Pharmacol.* 26:453-462
- Thompson KH y Goldin DV. (1995). Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutrition Research.* 15: 1377-1410.
- Wang-Tso Lee and Chen Chang. (2004). Magnetic resonance imaging and spectroscopy in assessing 3-nitropropionic acid-induced brain lesions: an animal model of Huntington's disease. *Progress in Neurobiology.* 72: 87-110.

- Weisiger RA y Fridovich I. (1973). Superoxide dismutasa, organelle specificity. *J. Biol. Chem* 248: 3582-3592.
- Weller M and Paul S. M. (1993). 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol.* 248:223-228.
- Whetsell WO Jr, Shapira NA, Whensell. (1993). 68(4): 372-387.
- Williams RN y Paterson CA. (1986). *Exp. Eye Res.* 43: 7-13.
- Zeevalk GD., Bernard LP y Shinha C. (1998). Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 20: 444-453.

10.- ANEXO

**ANTIOXIDANT EFFECTS OF TAURINE,
VITAMIN C, AND VITAMIN E ON
OXIDATIVE DAMAGE IN HIPPOCAMPUS
CAUSED BY THE ADMINISTRATION OF
3-NITROPROPIONIC ACID IN RATS**

ERIKA RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma
de México, México

QUERY SHEET

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| Q1--p. 1133 | Pls. supply "received" date |
| Q2--p. 1134, line 20 | Add these to refs.--Bendich |
| Q3--p. 1142, line 21 | 2002 in refs. |
| Q4--p. 1142, line 27 | 1998 in refs. |
| Q5--p. 1143, refs. | Cite or delete Alston |
| Q6--p. 1144, refs. | Same title as Ames book? |
| Q7---p. 1144, refs. | Spell out journal title |
| Q8--p. 1144, refs. | Vol. # correct? |

**ANTIOXIDANT EFFECTS OF TAURINE,
VITAMIN C, AND VITAMIN E ON
OXIDATIVE DAMAGE IN HIPPOCAMPUS
CAUSED BY THE ADMINISTRATION OF
3-NITROPROPIONIC ACID IN RATS**

ERIKA RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma
de México, México

CONCEPCIÓN RUGERIO-VARGAS

Departamento de Biología Celular y Tisular
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma
de México, México

ALBA I. RODRÍGUEZ

Gossett Neurology Laboratories
Henry Ford Health System
Detroit, Michigan, USA

GABINO BORGONIO-PÉREZ

SELVA RIVAS-ARANCIBIA

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma
de México, México

Received December 12, 2003

Address correspondence to Dr. Selva Rivas-Arancibia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-250, México, D.F. C.P. 04510.
E-mail: srivas@servidor.unam.mx

Q1

The administration of 3-nitropropionic acid increases reactive oxygen species (ROS). Antioxidant defense mechanisms buffer these ROS converting them into non-damaging compounds. Taurine and vitamins C and E are antioxidants that play a role in the defense against cellular damage. This study examines the antioxidant effect of taurine, vitamin C, and vitamin E on acute hippocampal damage caused by 3-NP. Animals treated with 3-NP increased lipid peroxidation levels and astrocytic damage in the hippocampus. Administration of taurine, vitamin C, and vitamin E partially protected from oxidative damage, indicate that while all substances had antioxidant effects, only taurine showed morphological protection in surviving cells.

Keywords antioxidants, hippocampus, 3-NP, oxidative stress, taurine, vitamin C, vitamin E

Oxidative stress is a contributing factor to alteration caused in neurodegenerative processes. The hippocampus is the brain structure most vulnerable to oxidative stress. Approximately 50% of the axon-spine interfaces are associated with astrocytes (Aranque et al., 2001). They play an important role in metabolic and structural functions. There are many functional interactions between astrocytes and neurons, like the potential role in integrating synaptic signals and providing feedback responses. In the adult, glial cells maintain neuronal homeostasis, reparation, and synaptic plasticity.

The 3-nitropropionic acid (3-NP) administration increases reactive oxygen species (ROS). However, the mechanisms of oxidative damage are not fully understood (Schulz et al., 1996; La Fontaine et al., 2000). 3-NP, a mitochondrial toxin that is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase (SDH), inhibits complex II of the respiratory chain and the tricarboxylic acid cycle, which leads to decreases in ATP synthesis and activation of NMDA receptors. It also causes excitotoxicity and increases the level of free radicals (Brouillet et al., 1999; Lafon-Cazal et al., 1993), leading to alterations in cell membranes (lipoperoxidation), DNA and protein damage, and cell death (Ames, 1997; Luft, 1991). Systemic administration of 3-NP causes damage to cells in the caudate putamen, globus pallidus, substantia nigra, and hippocampus (Beal et al., 1993; Hamilton & Gould, 1987). 3-NP induces excitotoxicity-mediated neuronal death in which intracellular and intramitochondrial calcium influx take part (Wullner et al., 1994). The astrocytes are more sensitive than neurons to cellular calcium overload induced by this toxin (Fukuda

et al., 1998). This is exacerbated by impairment in glutamate uptake 1
in the glial cell. Nishino and colleagues (1997) convincingly dem-
onstrate a greater vulnerability of astrocytes to 3-NP. The astrocytes
express functional receptors for many different neurotransmitters 5
that lead to changes in intracellular calcium levels (Verkhraatsky &
Kettenmann, 1996; Verkhraatsky et al., 1998).
Taurine is an antioxidant that protects against neuronal damage
caused by oxidative stress (Huxtable, 1992; Rivas-Arancibia et al.,
2000). It is synthesized by astrocytes in the brain and participates in 10
the glial-neuronal interaction. Taurine is released from glial in the
hippocampus by osmolarity changes (Decavel & Hatton, 1995) and
plays an antioxidant role during excitotoxicity, protecting neurons
from glutamate toxicity. This protective mechanism is physiologi-
cally important for the brain. After cell damage, taurine synthesis is 15
induced in high concentrations (Huxtable, 1992; Ogasawara et al.,
1994; Rivas-Arancibia et al., 2000). Vitamin E protects cell mem-
branes from free radical-induced oxidation, and vitamin C (ascorbic
acid) can directly scavenge free radicals in plasma and suppress
their reactivity (Bendich, 1996, 1994). 20 Q2

Previous studies demonstrated that doses of 3-NP (20 mg/kg)
twice each 48 hrs (Rivas-Arancibia et al., 2000), caused cellular
damage and motor alterations, one week after administration. Acute
short-term effects of 3-NP have not been studied.

Other studies have demonstrated that there is an increase of lipid 25
peroxidation levels after 3-NP administration in acute models (Juárez-
Meavepeña et al., 2002). It indicates an oxidative stress state pro-
duced by 3-NP. Therefore, the antioxidant administration in initial
stages could protect against oxidative damage.

The aim of this work was to study astrocytic oxidative damage 30
caused by ATP deficit in hippocampus, as well as, evaluated the
antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on hippo-
campal damage caused by the administration of 3-NP.

MATERIALS AND METHODS 35

Sixty male Wistar rats (400 g) were individually housed in acrylic 39
boxes with free access to food (Nutri-cubo; Purina, USA) and water.

They were divided into 5 groups and received one of the following treatments: (1) control (0.9% sterile saline i.p.); (2) 20 mg/kg 3-NP i.p. (SIGMA, dissolved in 0.9% sterile saline); (3) 20 mg/kg 3-NP + 43 mg/kg taurine i.p. (SIGMA, dissolved in 0.9% sterile saline); (4) 20 mg/kg 3-NP + 100 mg/kg vitamin C i.p. (SIGMA, dissolved in 0.9% sterile saline), and (5) 20 mg/kg 3-NP + 100 mg/kg vitamin E i.p. (SIGMA, dissolved in mineral oil). In all treatments pH was adjusted to 7.4. The antioxidants were administered 10 min after the 3-NP injection. Four hours after receiving treatment, animals were sacrificed by decapitation. Following treatment, rats in each group were divided into two groups to examine lipid peroxidation or GFAP.

Establishment of 3-NP Experimental Doses and Time

Based on a previous curve dose-response study (5, 10, 15 and 20 mg/kg) this study quantified damage at 4 and 8 h using immunohistochemistry technique and lipid peroxidation levels. The authors elected a dose of 20 mg/kg and 4 h after administration, quantified astrocytic damage. This dose also causes a notable increase in levels of brain lipid peroxidation at 4 h.

Lipid Peroxidation Analysis

Lipid peroxidation levels were quantified using a K-ASSAY LPO kit (Kamiya Biomedical Co). Four hours after receiving treatment, animals were sacrificed by decapitation; hippocampus was dissected on an ice-cold plate and immediately weighed. Each tissue sample was homogenized in PBS 1:20 and stored at -70°C until day of the assay to measure lipid peroxidation. Homogenates of each sample were centrifuged. Supernatant was removed, and the enzyme reagent (ascorbic oxidase and lipoprotein lipase) was added. The mixture was incubated for 5 min at a temperature of 30°C and the chromogen reagent (10-N- methylcarbamoyl-3,7-dimethylamino-10-H-phenothiazine (MCDP) was added. The resulting mixture was incubated for 10 min at a temperature of 30°C . Finally, absorbance was measured at 675 nm in a spectrophotometer. A two-point calibration curve was made using the saline blank (0 nmol/ml) and the 50 nmol/ml cumene hydroperoxides standard provided with the kit. The results were then calculated using the following equation, whose

linear range for this assay is between 2.0 and 300 nmol/ml: LPO [nmol/ml] = [(Es - Eb) × 50.0/Estd - Eb], where Es is sample absorbance, Estd is absorbance of 50 nmol/ml standard, and Eb is blank absorbance.

5

Immunohistochemical Analysis

Four hours after receiving treatment, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). The brains were post-fixed with 10% formaldehyde for 24 h. Coronal sections of the hippocampus were cut at 18 μm on a cryostat, thaw-mounted onto superfrost slides, and processed for GFAP immunohistochemistry as follows: Sections from each brain were permeabilized for 1 h at room temperature with 0.03% Triton X-100 (SIGMA), 0.03% Lysine (SIGMA), and 10% normal horse serum for GFAP. After washes with phosphate buffered saline (PBS), sections were incubated overnight with primary antibody at 4°C in a humidified chamber. Mouse monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP (SIGMA) 1:200) was used as primary antibody. Sections were then washed and incubated for 2 h at room temperature using biotinylated horse anti-mouse secondary antibody (1:200, Vector). The ABC system (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories) with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Pierce) as the chromogen was used to visualize bound antibody. After that, the tissues were contrasted with hematoxilin-buffer solution. Representative brain sections from each group were processed in parallel. Following cover slipping with Permount; the sections were examined with a WPI, Inc. H605T Microscope and photographed. The number of astrocytes cells were quantified, using an average of ten randomly selected fields of three sections from each rat.

15

20

25

30

RESULTS

35

Lipid Peroxidation Analysis.

A Kruskal-Wallis test showed significant differences in lipid peroxidation levels in hippocampus between groups ($p < 0.001$). Dunnett

39

tests showed that animals receiving 3-NP had increased lipid peroxidation levels compared to controls and that animals receiving taurine, vitamin C, or vitamin E after 3-NP injection had significantly lower lipid peroxidation levels than those receiving 3-NP alone ($p < 0.05$) (Figure 1).

Immunohistochemical Analysis

In the control group (Figure 2A and B), GFAP-reactive astrocytes with well-defined processes were distributed throughout the hippocampus. In contrast, the hippocampus of 3-NP treated rats exhibited increased GFAP immunoreactivity per cell (qualitatively), astrocytic

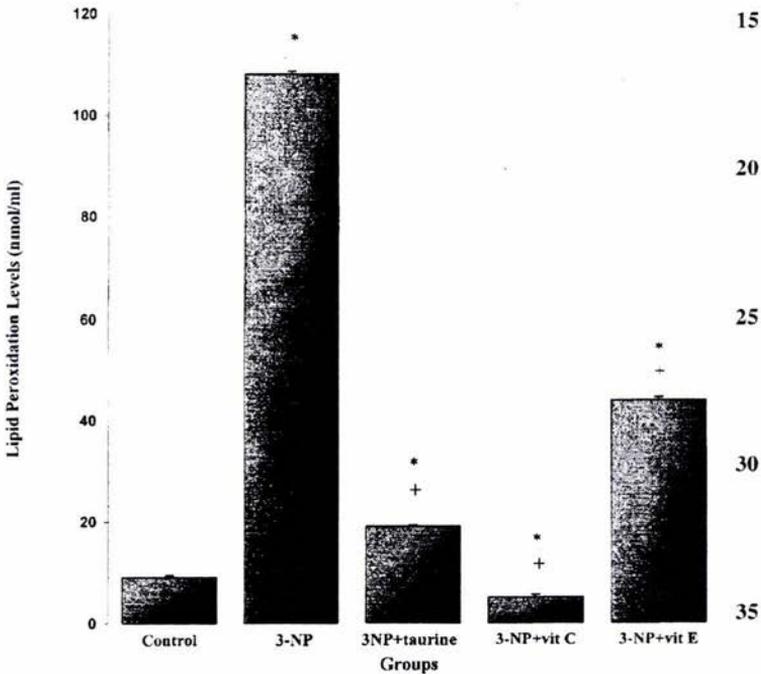


FIGURE 1. Effects of 3-NP administration on lipid peroxidation levels ($*p < 0.05$ vs. control; $+p < 0.05$ vs. 3-NP). Mean \pm SE. The treatment is depicted on the abscissa; lipid peroxidation levels in nmol/ml are depicted on the ordinate ($n = 6$).

1

5

10

15

20

25

30

35

39

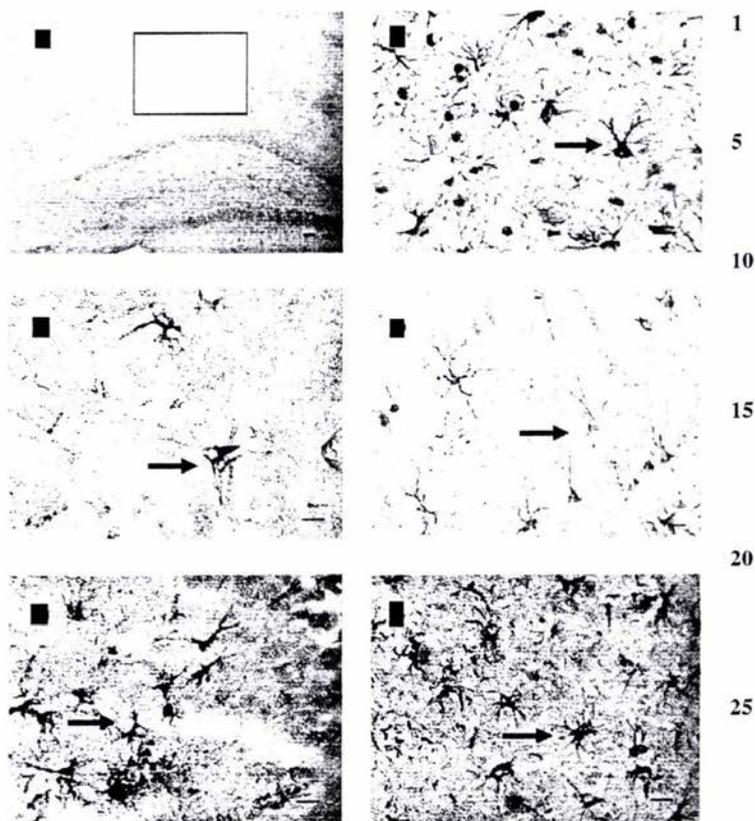


FIGURE 2. Light photomicrographs of astrocytes immunolabeled for GFAP. (A) Control 4x, the rectangle indicate hippocampus area that is shown in 40x. (B) Control 40x, (C) 3-NP 40x, (D) 3-NP + Taurine, (E) 3-NP + Vitamin C, (F) 3-NP + Vitamine E. (→) Astrocytes. Bars represent 50 μ m.

swelling and shortening of processes (Figure 2C). Although there were fewer astrocytes present, the 3-NP + Taurine hippocampus conserved morphology, showing more similarity to controls (Figure 2D). The hippocampus of animals treated with 3-NP + vitamin C showed a decrease of process size and increased GFAP immunoreactivity per cell (qualitatively) (Figure 2E) and that of animals treated

with 3-NP + vitamin E exhibited astrocytic swelling, shortening of processes, and increased GFAP immunoreactivity in each cell (Figure 2F), although these effects were not as severe as in the 3-NP group.

Astrocyte Number

A Kruskal-Wallis test showed significant differences in number of astrocytes in hippocampus between groups ($p < .01$). Dunett tests showed that animals receiving 3-NP had decreased number of astrocytes compared to controls and that animals receiving taurine, vitamin C, or vitamin E after 3-NP injection had a significantly lower number of astrocytes than those receiving 3-NP alone ($p < .05$) (Figure 3).

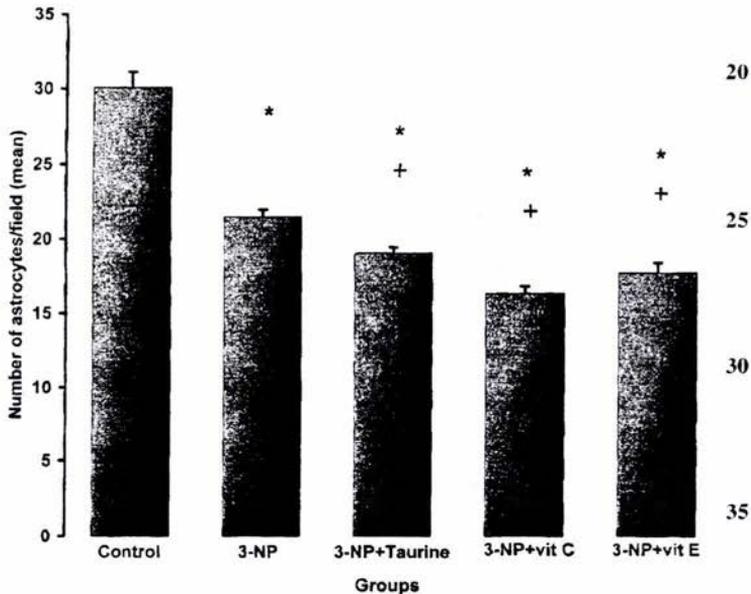


FIGURE 3. Effects of 3-NP administration on number of astrocytes in hippocampus ($*p < 0.05$ vs. control; $+p < 0.05$ vs. 3-NP). Mean \pm SE. The treatment is depicted on the abscissa; number of astrocytes/field are depicted on the ordinate ($n = 6$).

DISCUSSION

1

Recent studies implicate oxidative stress in 3-NP-induced neurotoxicity (La Fontaine et al., 2000; Binienda & Kim, 1997) leading to increased lipid peroxidation levels (Nishino et al., 1997). In the present study, 3-NP administration caused energetic deficit, which produces oxidative stress in hippocampus. It is shown by dramatic increases in lipid peroxidation levels in this structure (Figure 1). Hippocampus is vulnerable to oxidative stress and 3-NP toxicity. The damage in other brain areas is found also with systemic administration, that is, striatum, frontal cortex, cerebellum, and so on. Nevertheless, intrastriatal administration is used frequently as a model of Huntington's disease.

5

10

Results showed damage on astrocytic cell caused by acute oxidative stress. Actually, an astrocyte can make contact with a neuron and a capillary. For this reason, they are principal targets of systemic 3-NP administration (Alexi et al., 1998; Rivas-Arancibia et al., 2000). Due to the physiological role that astrocytes play, they are essential for neuronal survival and very important in neurodegenerative processes.

15

20

In the present study, increased GFAP immunoreactivity and astrocytic damage in the hippocampus was evident 4 h after administration of the toxin (Figure 3). As astrocytes lose the capacity to maintain their internal homeostasis and normal morphology, they enter a process that begins with hypertrophy and edema, and leads to cellular death (Kreutzberg et al., 1989). Results showed that antioxidants may be able partially to prevent this damage. These experiments show that the number of astrocytes decrease in all treatments. This could be interpreted as tissue damage increasing (Figure 2). However, the morphological integrity of hippocampal astrocytes that survive was maintained when taurine was administered to 3-NP treated animals. It could mean that there is a maintenance of survivor cellular function (Figure 3D). The authors have also shown this neuroprotective effect in striatum (Rivas-Arancibia et al., 2001).

25

30

35

Treatment with taurine, vitamin C, and vitamin E prevented increase in lipid peroxidation levels. The fact that antioxidants ameliorated these alterations indicates that part of the damage may be due to oxidative stress produced by free radicals as a consequence of 3-NP administration.

39

Vitamin C and E treatments were not as effective as taurine in preventing the 3-NP-induced morphologic damage in survivor cells (Figure 3E and F). Thus, although taurine, vitamin C, and vitamin E all exhibited antioxidant effects, seen as decreased lipid peroxidation, they did not provide equal neuroprotective effects against cellular death. This suggests that although part of the damage may be mediated by oxidative stress, other factors may contribute to the damage and death of cells.

Although the oxidative stress could start a cell damage process after 3-NP administration, the ROS generated not only act on biomolecules caused oxidation. They also induce metabolic changes that lead to activation of oxidative pathways (Jae et al., 2003). The pro-oxidant metabolites are produced and can interfere with enzymatic antioxidant defense systems. It increases oxide reduction imbalance, raising the excitatory neurotransmitters release (John et al., 2000) and decreasing the glutamate recapture by the astrocytic cells. Conversely, oxidative signals induce activation of pathways that lead to cell death (caspases). The ROS also activate the nuclear factor transcription as Nuclear Factor κ -B, which induced transcription of inflammatory mediators (Wulf, 2002). These factors contribute to increased damage. Finally osmotic changes are produced by lipid and protein oxidation of cellular membranes. This would explain why taurine provided more neuroprotection than vitamins C and E. In addition to its effects as an antioxidant, taurine may also provide protection from neuronal damage via its osmoregulatory properties (Pasantes-Morales & Schousboe, 1988). Taurine is released by the cell during damage and acts to prevent the rapid influx of sodium and water, thereby helping to maintain osmotic equilibrium and diminishing cellular edema. Additionally, it also has modulatory effects on calcium, preventing the massive influx of calcium that occurs during oxidative stress. This avoids the formation of the mitochondrial transition pore, decreases ATP production and energy depletion that lead to cell death.

This study showed that although all treatments demonstrated antioxidant effects, this effect, in and by itself, was insufficient to protect astrocytes totally from damage and cellular death. One interpretation of this finding is that once oxidative metabolic cascades have been activated, cells enter a vicious cycle in which the oxide-

reduction imbalance continues, leading to a loss in the efficiency of endogenous antioxidant defenses. 1

The lost of oxide-reduction balance activates cellular signals, which unchain an event cascade (such as osmotic changes, inflammatory processes, gene modulation and protein transcription). Once these events have been activated, they will not depend on redox balance. But equilibrium of oxide-reduction reactions prevents oxidative stress state in neighbor cells. 5

However, why do some cells survive? What mechanisms allow these cells to recuperate from damage in the presence of taurine? Future studies are needed to resolve these questions. 10

In conclusion, this study found that taurine, vitamin C, and vitamin E exhibited antioxidant effects, preventing lipid peroxidation caused by 3-NP, indicating that 3-NP-induced hippocampal neurotoxicity is mediated, in part, by oxidative stress. Although all substances had antioxidant effects, they did not protect cell death. However, only taurine was able to protect hippocampal survivor astrocytes and it was possibly due to its effects at different levels. 15

As neurodegenerative diseases are complex systems in which damage may occur by diverse mechanisms, treatments such as taurine that act at different levels (e.g., antioxidant, energetic, etc.) may provide more optimal therapeutic strategies than antioxidants alone. 20

The symptomatology of many neurodegenerative diseases displays when a great number of cells have died. The possibility of survivor cells protection during diagnosis is essential to detain disease progress and prevent future deterioration of patients. 25

REFERENCES 30

- Alexi, T., Hughes, P. E., Faull, R. L. M., & Williams, E. C. (1998). 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: Cooperative pathways of neurodegeneration. *NeuroReport*, 9(11), R57-R64.
- Alston, T. A., Mela, L., & Bright, H. J. (1977). 3-Nitropropionate, the toxic substance of indigofera, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 74, 3767-3771. Q5 35
- Ames, A. (1997). *Mitochondria and free radicals in neurodegenerative disease*. New York: Wiley-Liss.
- Aranque, A., Carmignoto, G., & Haydon, P. G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review of Physiology*, 63, 795-808.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., 39

- Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R., & Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal of Neuroscience*, *13*, 4181–4192. **1**
- Binienda, Z., & Kim, C. S. (1997). Increase in levels of total free fatty acids in rat brain regions following 3-nitropropionic acid administration. *Neuroscience Letters*, *230*, 199–201.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. F., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*, *59*, 427–468. **5**
- Decavel, C., & Hatton, G. I. (1995). Taurine immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: Prominent localization in glial cells. *Journal of Comparative Neurology*, *354*, 13–26.
- Fukuda, A., Deshpande, S. B., Shimano, Y., & Nishino, H. (1998). Astrocytes are more vulnerable than neurons to cellular Ca²⁺ overload induced by mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*, *87*(2), 497–507. **10**
- Hamilton, B. F., & Gould, D. H. (1987). Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: A type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathologica*, *72*, 286–297.
- Huxtable, R. J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, *72*, 101–162.
- Jae, K. R., Atsushi, N., Jean, K., Min, C. L., James, G. M., Seung, U., & Kim. (2003). acid: In vitro and in vivo studies. *Neurobiology of Disease*, *12*(2), 121–132. **15**
- John, R. J., Bonnie, L. R., Syed, F. A., & Binienda, Z. (2000). Dopamine toxicity following long term exposure to low doses of 3-nitropropionic acid (3-NPA) in rats. *Toxicology Letters*, *116*, 113–118.
- Juárez-Meavepeña, M., Acosta-Vázquez, F., Pineda-Solis, K., & Rivas-Arancibia, S. (2002, June). Behavioral and glial changes in striatum, induced by 3-nitropropionic acid treatment in rat. *Abstracts of the International Behavioral Neuroscience Society*, *11*, Capri, Italy. **20**
- Kreutzberg, G., Graeber, M., & Streit, W. (1989). Neuron-glia relationship during regeneration of motoneurons. *Metabolic Brain Disease*, *41*, 81–85.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culeasi, M., & Bockaert, J. (1993). NMDA dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, *364*, 535–537.
- La Fontaine, M. A., Gedes, J. W., Banks, A., & Butterfield, D. A. (2000). Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: Insights into Huntington's Disease. *Journal of Neurochemistry*, *75*(4), 1709–1715. **25**
- Luft, R. (1991). *Mitochondria and free radicals in neurodegenerative disease*. New York: Wiley-Liss. **Q6**
- Nishino, H., Kumazaki, M., Fukuda, A., Fujimoto, I., Shimano, Y., Hida, H., Sakurai, T., Deshpande, S. B., Simizu, H., Morikawa, S., & Inubushi, T. (1997). Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: Involvement of dopamine toxicity. *Neuroscience Research*, *27*, 343–355. **30**
- Ogasawara, M., Nakamuro, Y., Koyama, I., Remoto, M., & Yoshida, T. (1994). *Taurine in health and disease*. New York/London: Plenum.
- Pasantes-Morales, H., & Schousboe, A. (1998). Volume regulation in astrocytes: A role for taurine as an osmoreflector. *Journal of Neuroscience Research*, *20*(4), 503–509. **Q7**
- Rivas-Arancibia, S., Rodríguez, A. I., Zigova, T., Willing, A. E., Brown, W. D., Cahill D. W., & Samberg, P. R. (2000). Taurine increases rat survival and reduces striatal damage caused by 3-nitropropionic acid. *International Journal of Neuroscience*, *00*, 1–13. **Q8**
- Rivas-Arancibia, S., Rodríguez, A. I., Zigov, T., Willing, A. E., Brown W. D., Cahill D. W., & Samberg, P. R. (2001). Taurine protects against neurodegeneration produced by 3-nitropropionic acid in rats. *International Journal of Neuroscience*, *108*, 56–67. **35**
- Schulz, J. B., Henshaw, D. R., MacGarvey, U., & Beal, M. F. (1996). Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem. Int.*, *29*, 167–171. **Q7**
- Verkhatsky, A., & Kettenmann, H. (1996). Calcium signaling in glial cells. *Trends in Neuroscience*, *19*, 345–352. **39**

Verkhatsky, A., Orkand, R. K., & Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: Homeostasis and signaling function. <i>Physiological Reviews</i> , 78, 991-1041.	1	Q7
Wulf, D. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. <i>Physiological Reviews</i> , 82(1), 47-95.		
Wullner, U., Young, A. B., Penney, J. B., & Beal, M. F. (1994). 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. <i>Journal of Neurochemistry</i> , 63, 1772-1781.	5	
		10
		15
		20
		25
		30
		35
		39