



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL Fe(TPPS) SOBRE ALGUNOS INDICADORES
DE NEUROTOXICIDAD INDUCIDOS POR EL ÁCIDO
QUINOLÍNICO EN RATAS**

TESIS EXPERIMENTAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CAROLINA GONZÁLEZ CORTÉS



MÉXICO, D. F.



2005

m342440

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Ruth Elizabeth Román Palacios

VOCAL: Prof. Alberto Gómez Gutiérrez

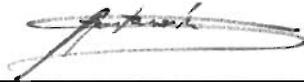
SECRETARIO: Prof. Abel Santamaría Del Ángel

1^{er} SUPLENTE: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

2^o SUPLENTE: Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Este trabajo fue apoyado por DGAPA IN227103 y IX203504 IN227103, se desarrolló en el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores/Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", México D.F.

ASESOR



Dr. Abel Santamaría Del Ángel

SUSTENTANTE



Carolina González Cortés

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Abel Santamaría por confiar en mi y apoyarme no solo en la elaboración de este trabajo sino en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Pedraza por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto.

De igual manera a Sonia Galván por brindarme apoyo.

A Verónica Pérez por ayudarme y alentarme durante la elaboración de este trabajo y principalmente por brindarme su amistad.

DEDICATORIAS

A mi mamá por estar siempre a mi lado y apoyarme en todas mis decisiones, también debería estar en los agradecimientos porque tengo mucho que agradecerle ya que sin ella, no hubiera logrado todo esto.

A mis tías Elena, Celia y Betty de igual manera, por todo lo que han hecho por mí y por estar siempre a mi lado.

A Carmen y Valeria por estar conmigo desde que tengo memoria y demostrar que no hace falta tener lazos sanguíneos para considerarlo de tu familia.

A la familia Nieto, por su apoyo.

A mis amigos por acompañarme en esta etapa, ya que me permitieron tener un equilibrio entre mi vida profesional y personal, el cual es indispensable para cumplir metas.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. ABREVIATURAS..... | 5 |
| 2. INTRODUCCIÓN | |
| 2.1. Enfermedad de Huntington (EH)..... | 7 |
| 2.1.1. Aspectos clínicos de EH..... | 8 |
| 2.1.2. Características neuropatológicas..... | 8 |
| 2.1.3. Aspectos bioquímicos de EH..... | 10 |
| 2.1.4. Excitotoxicidad y modelos experimentales de EH..... | 11 |
| 2.2. Receptores para NMDA..... | 12 |
| 2.3. Ácido quinolínico..... | 15 |
| 2.3.1. Toxicidad..... | 15 |
| 2.4. Estrés oxidativo..... | 17 |
| 2.4.1. Radicales libres y especies reactivas | 18 |
| 2.5. Peroxinitrito..... | 20 |
| 2.5.1. Toxicidad..... | 21 |
| 2.6. Metaloporfirinas..... | 23 |
| 2.6.1. Mecanismo de acción | 24 |
| 2.6.2. Fe(TPPS) | 25 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 27 |
| 4. OBJETIVOS..... | 27 |
| 5. MATERIALES Y METODOS | |
| 5.1. Diagrama de Flujo..... | 28 |
| 5.2. Reactivos y animales..... | 28 |
| 5.3. Conducta de Rotación..... | 29 |
| 5.4. Niveles estriatales de GABA..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 6. RESULTADOS | |
| 6.1. Efecto del Fe(TPPS) sobre conducta de rotación..... | 31 |
| 6.2. Efecto del Fe(TPPS) sobre los niveles estriatales de GABA..... | 32 |
| 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 35 |
| 8. CONCLUSIÓN..... | 37 |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 38 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleótido |
| 3-AMP | Ácido 3-mercaptopropiónico |
| AMPA | α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato |
| APO | Apomorfin |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BH ₄ | (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina |
| CAG | Triplete de 5'-Citosina-Adenina-Guanina-3' |
| CAT | Colina acetiltransferasa |
| Fe(TPPS) | 5,10,15,20-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirinato de hierro(III) |
| FNT- α | Factor de necrosis tumoral-alfa |
| GABA | Ácido γ -amino butírico |
| GAD | Ácido glutámico descarboxilasa |
| GFAP | Proteína ácida glial fibrilar (del inglés <i>Glial fibrillary acidic protein</i>) |
| GMPc | Guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GSH | Glutación reducido |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| EH | Enfermedad de Huntington |
| Htt | Proteína huntingtina |
| <i>htt</i> | Gen de la huntingtina |
| IBO | Ácido iboténico |
| KA | Ácido kaínico |
| NAD | Nicotiamida adenina dinucleótido |
| NADH | Nicotiamida adenina dinucleótido reducido |
| NADPH | Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| NF- κ B | Factor de transcripción nuclear κ B |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| 3-NP | Ácido 3-nitropropiónico |
| NO | Óxido nítrico |
| ONSi | Óxido nítrico sintetasa inducible |

| | |
|----------------|--|
| $O_2^{\cdot-}$ | Anión superóxido |
| $\cdot OH$ | Radical hidroxilo |
| ONOO $^-$ | Peroxinitrito |
| OPA | o-ftalaldehído |
| PARP | Poli-adenosina trifosfato ribosil polimerasa |
| QUIN | Ácido quinolínico |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| SOD | Superóxido dismutasa |

INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH)

La enfermedad de Huntington, es una neuropatía degenerativa hereditaria descrita por primera vez por George Huntington quien después de estudiar varias familias afectadas con el padecimiento en Long Island NY, Estados Unidos, presentó en 1872 su trabajo titulado "Sobre la Corea", en el que tal afección se reconoció como una entidad específica. En ese trabajo, Huntington realizó una minuciosa descripción de dicha patología, resaltando su aspecto hereditario, progresivo e irreversible, cuya sintomatología inicia en edades medias de la vida y se caracteriza por "corea" (del latín "*Chorea*" que significa "danza"). En reconocimiento a ese documento se le dio inicialmente el nombre inadecuado de "Corea de Huntington", ya que la enfermedad se desarrolla acompañada de otras alteraciones además de corea, tales como alteraciones del comportamiento y deterioro cognitivo (Harper, 1996).

La EH pertenece a una de la ocho enfermedades neurodegenerativas que resultan de la expansión del triplete (CAG)_n (codifica la glutamina) en ocho genes diferentes (Gusella y MacDonald, 2000; Zoghbi y Orr, 2000), en este caso el defecto genético se sitúa en el gen de la huntingtina (*htt*), localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). La proteína Htt contiene más de 3000 residuos de aminoácidos (Gusella et al., 1983). Evidencias experimentales sugieren que la muerte celular en la EH está ligada a una 'ganancia' de función de la Htt, por ejemplo una interacción con nuevas proteínas, debido a que la expansión de poliglutamina en la Htt mutada puede modificar la interacción normal de la Htt con proteínas o puede dar como resultado nuevas interacciones con otras proteínas; y que puede involucrar defectos energéticos, daño oxidativo y procesos excitotóxicos (Tobin y Signer, 2000; McMurray, 2001).

La aparición de la patología depende del número de repeticiones del triplete que se presenten; así, gente con menos de 35 repeticiones no desarrolla la enfermedad; con 35-39 repeticiones puede o no presentarla; con 40-60 repeticiones la desarrolla en la edad adulta; y gente con mas de 60 repeticiones la presenta antes de los 20 años (Tobin y Signer, 2000).

Su evolución inevitable hacia la muerte se ha establecido en cerca de 15 años para las formas adultas y de 8 a 10 años para las juveniles, aunque hay casos de pacientes que han llegado a sobrevivir de 25 a 35 años con la enfermedad. Por lo general, el fallecimiento se debe a neumonías y desnutrición (Coneally, 1984).

La prevalencia de esta enfermedad se considera de entre 5 y 10 casos por 100,000 habitantes, cifra que es algo menor en los países del este asiático y en la población de raza negra (Shoulson, 1984). En México no se cuenta con datos epidemiológicos al respecto, pero los estudios realizados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" reportan a 180 familias con este padecimiento hasta hace ocho años (Alonso et al., 1997).

2.1.1 Aspectos clínicos de EH

Clínicamente los primeros signos del desorden son sutiles y pueden consistir en ausentismos, irritabilidad y depresión, acompañados por impaciencia, pesadez, o caídas repentinas. Una eminente característica de la enfermedad son los movimientos coreiformes incontrolados, los cuales se caracterizan por ser movimientos aletorios en sacudidas que comprenden varias partes del cuerpo y movimientos de torsión repetitivos involuntarios, que gradualmente incrementan. Las expresiones faciales comienzan a ser distorsionadas y grotescas. Las funciones mentales, como aprendizaje y memoria pasan por deterioro similar y eventualmente el razonamiento desaparece. Una vez que la enfermedad comienza su inexorable curso, la persona afectada confronta años de disminución gradual de su capacidad, seguido por su inhabilitación total e inevitable muerte (Spiegel, 1995).

2.1.2 Características neuropatológicas

La apariencia general del cerebro de los pacientes con la EH es anormal (Fig. 1), el tamaño del cerebro se encuentra reducido con respecto a los cerebros normales, y en muchos casos el peso del cerebro disminuye hasta en un 30% con respecto a cerebros normales (Bruyn, 1968; Martin y Gusella, 1986).

Los rasgos anatomopatológicos característicos de la enfermedad son la presencia marcada de atrofia bilateral en el núcleo caudado y el putamen (denominados en conjunto cuerpo estriado) con alargamiento de los ventrículos laterales. La atrofia del núcleo caudado es la que confiere el aspecto peculiar que presentan las astas frontales de los ventrículos laterales en las pruebas de neuroimagen.

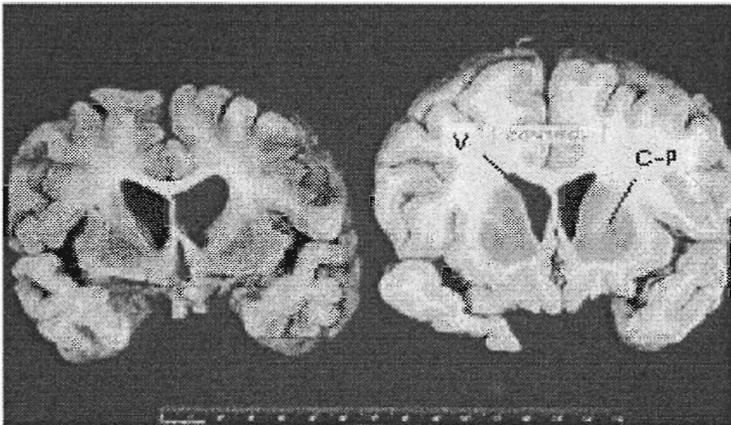


Figura 1. Fotografía de un corte coronal del cerebro de un individuo normal (derecha) y de un paciente con la EH (izquierda), que muestra disminución en la masa cerebral, atrofia del caudado-putamen (C-P) y dilatación de los ventrículos laterales (V) (Vonsattel et al., 1985).

Dentro del cuerpo estriado, las neuronas espinosas de tamaño mediano (Fig. 2), que representan el 95% de las neuronas estriatales, son de tipo GABAérgicas y proyectan sus axones hacia neuronas en el globo pálido, son la población celular más sensible en la EH mostrando cambios en sus dendritas y alteraciones en la densidad, la forma y el tamaño de las espinas.

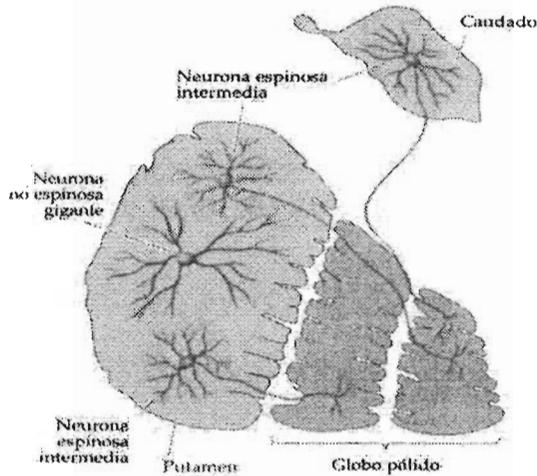


Figura 2. Tipos de neuronas en el caudado y el putamen.

2.1.3 Aspectos bioquímicos de la EH

En la EH, la alteración neuroquímica relevante es una disminución del GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, así como de la actividad de la enzima limitante en su síntesis, la ácido glutámico descarboxilasa (GAD); de acetilcolina y de su correspondiente enzima de síntesis, la colina acetiltransferasa (CAT); reducción de los niveles de los péptidos localizados en las neuronas espinosas y disminución del número de los receptores para aminoácidos excitadores localizados en las espinas dendríticas de las neuronas que degeneran (Pasantes et al., 2000), así como preservación de neuronas que contiene NADPH diaforasa (Albin et al., 1990; Reiner et al., 1988).

Entre otros cambios neuroquímicos, tanto en etapas tempranas y avanzadas que ocurren en la EH se encuentra una pérdida de las terminales dopaminérgicas estriatales (Ariano et al., 2002) y una disminución en la unión de receptores a dopamina (Richfield et al., 1991). Los niveles de somatostatina y neuropéptido Y están incrementados más de 3 a 5 veces en caudado/putamen y globo pálido, sin cambios en otras áreas del cerebro (Schwarcz et al., 1983).

2.1.4 Excitotoxicidad y modelos experimentales de EH

El modelo de excitotoxicidad está basado en la sobreexcitación de las neuronas como consecuencia de la estimulación continua a los receptores para aminoácidos excitadores, principalmente del subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), produciendo así una cascada de alteraciones fisiológicas de las neuronas que culmina en la muerte neuronal (Whetsell y Shapira, 1993). La excitotoxicidad como posible causa de la muerte neuronal en la EH se apoya en las pruebas experimentales que señalan que la inyección de antagonistas de aminoácidos excitadores como el ácido kaínico (KA) y el ácido quinolínico (QUIN) a roedores produce ciertos cambios anatómicos, histológicos, bioquímicos y funcionales que se presentan en los pacientes con la EH (Pasantes et al. 2000).

El interés de los investigadores por conocer el mecanismo de la enfermedad y encontrar tratamientos terapéuticos eficaces ha llevado al desarrollo de modelos experimentales que reproduzcan o simulen las alteraciones bioquímicas, patológicas y conductuales típicas de la EH (Sipione y Cattaneo 2001).

Agentes excitotóxicos, como el KA, el ácido iboténico (IBO) y el compuesto endógeno QUIN, al ser administrados intracerebralmente, inducen muerte de neuronas estriatales, pero con diferencias específicas con respecto a las presentadas en la EH (Beal et al., 1986; Pérez-Severiano y Ríos, 2000). La neurotoxina fúngica ácido 3-nitropropiónico (3-NP), al ser administrada sistémicamente, inhibe a la succinato deshidrogenasa, enzima clave en la cadena transportadora de electrones y en el ciclo de Krebs, reduciéndose así la producción de ATP de las neuronas y de este modo activando receptores para NMDA, seguido de una muerte neuronal excitotóxica secundaria. Sin embargo, el QUIN reproduce un patrón más parecido al de la neuropatología estriatal encontrada en la EH, como se puede observar en la tabla comparativa No.1 (Bruyn y Stoof, 1990).

| Molécula Neuroactiva | Pacientes (EH) | Ratas (QUIN) | Ratas (KA o IBO) | Ratas (3-NP) |
|--|----------------|--------------|------------------|--------------|
| GABA/GAD | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Acetilcolina/CAT | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Sustancia P | ↓ | ↓ | ↓ | = |
| Dopamina | = | = | = | ↓ |
| Somatostatina | ↑ | = | ↓ | = |
| Neuropéptido Y | ↑ | = | ↓ | = |
| Encefalina | ↓ | ↓ | = | = |
| Sobreactivación receptores NMDA | ↑ | ↑ | = | = |
| ↓ Disminuye, ↑ Aumenta, = Sin cambio (en términos de cantidad) | | | | |

Tabla 1. Comparación de los modelos de la EH

2.2 RECEPTOR PARA NMDA

Probablemente existen más estudios sobre los receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) que sobre cualquier otro receptor en el sistema nervioso. La razón es simple, los receptores tipo NMDA, además de ser muy abundantes en el sistema nervioso, están implicados en numerosas funciones, algunas de ellas tan importantes para el buen funcionamiento del cerebro como el aprendizaje o la memoria, mientras que en otras ocasiones están implicados en mecanismos de muerte neuronal o en enfermedades. Sin lugar a dudas, estas razones, entre otras, han impulsado el estudio de estos receptores.

El glutamato, uno de los neurotransmisores más abundantes en el sistema nervioso (liberado en más de la mitad de las sinapsis del sistema nervioso), realiza su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Hasta el momento se han identificado varios tipos principales de receptores para el glutamato, tres de ellos son canales iónicos regulados por ligando, mientras que otros tres, denominados receptores metabotrópicos de glutamato, no funcionan como canales iónicos aunque pueden actuar indirectamente sobre los canales iónicos. A los primeros se les denomina también receptores ionotrópicos ya que la unión del

neurotransmisor con el receptor provoca la apertura del canal con el consiguiente paso de los iones. Los receptores ionotrópicos de glutamato se denominan según la molécula agonista que los activa: los receptores tipo NMDA por el N-metil-D-aspartato, los receptores de tipo AMPA por α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato, y los receptores de tipo kainato por el ácido kaínico. Estos tres tipos de receptores forman canales catiónicos no selectivos, permeables tanto para el Na^+ como para el K^+ , de manera que la unión del glutamato sobre cualquiera de ellos provoca una despolarización de la membrana postsináptica (un potencial excitador postsináptico). A diferencia de los otros dos tipos de receptores ionotrópicos, AMPA y kainato, el receptor tipo NMDA posee una serie de características distintivas que lo hacen único entre todos los receptores ionotrópicos. Uno de esos aspectos, quizá el más significativo, es que el canal formado por el receptor permite el paso de los iones Ca^{2+} , además del Na^+ y K^+ , lo que implica un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la neurona postsináptica cada vez que el receptor se activa (Dávila, 2004).

El receptor tipo NMDA es una proteína muy compleja y fuertemente regulada (ver figura 3) formada por diferentes combinaciones de varias subunidades (denominadas NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C y NMDAR2D). La subunidad NMDAR1 posee todas las propiedades fundamentales necesarias para constituir un canal funcional y puede estar presente en ocho isoformas diferentes. La otra familia de proteínas que contribuye a la formación de receptores NMDA funcionales está constituida por cuatro variantes de la subunidad NMDAR2 (NMDAR2A-2D), codificadas por cuatro genes separados. Distintas combinaciones de la subunidad fundamental NMDAR1 con las otras subunidades dan lugar a receptores NMDA con diferentes propiedades funcionales, que pueden estar distribuidas en áreas encefálicas específicas y/o que pueden definir respuestas fisiológicas o patológicas distintas en respuesta al glutamato (Dávila, 2004). Su conductancia al Ca^{2+} es notablemente alta y es ésta quizá su característica más destacable y la responsable de muchas de sus funciones. Una gran parte de las acciones mediadas por estos receptores se basa en la regulación del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. La activación de los receptores tipo NMDA permite un rápido influjo de Ca^{2+} , con la consiguiente elevación intracelular de Ca^{2+} , lo cual dispara una cascada de sistemas de segundos mensajeros que podría producir acciones muy diversas (Kornhuber y Weller, 1997).

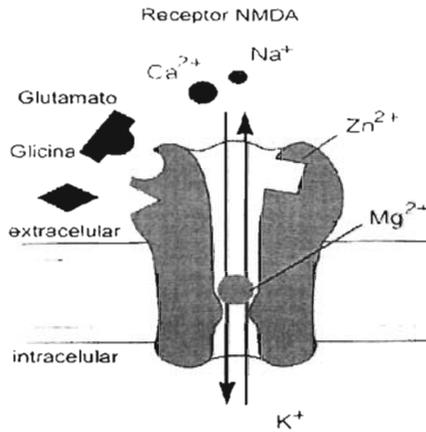


Figura 3. Receptor tipo NMDA

Otra característica especial de este receptor es que para que el canal se abra se necesita, además del glutamato, la presencia de un co-agonista (glicina). Al igual que la glicina, ciertas poliaminas modulan positivamente el canal, mientras que el zinc y un exceso de protones lo modulan negativamente. Sin embargo, lo más llamativo de este receptor es que comparte características funcionales de canales regulados por ligando y de canales sensibles al voltaje y dependientes de uso. Esta propiedad está relacionada con el bloqueo efectivo del canal del receptor tipo NMDA por el ión Mg^{2+} , cuando el potencial de membrana está próximo al valor de reposo. Por ejemplo, este bloqueo es eliminado transitoriamente cuando la membrana se despolariza, por estimulación repetitiva previa.

Si bien, funciones 'normales' dependen de la activación precisa de los receptores NMDA en el momento y lugar adecuados, es cierto también que un desequilibrio producido por la sobreactivación del receptor (por ejemplo, por liberación excesiva de glutamato) podría conducir a ciertas enfermedades como la epilepsia o a la muerte neuronal por sobreexcitación por ejemplo, en situaciones de hipoxia.

2.3 ACIDO QUINOLÍNICO

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico o ácido quinolínico (QUIN) es una toxina endógena agonista de los receptores a NMDA que causa lesiones excitotóxicas en el cerebro (Schwarcz et al. 1983; Stone y Connick, 1985). Es formado por la vía de la kinurenina (Fig. 4), vía catabólica del triptofano; bajo condiciones normales, gran parte de este aminoácido sigue la vía hasta formar NAD, y sólo una pequeña proporción del metabolismo diario del triptofano deriva a los otros metabolitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas de constante disposición de triptofano, la producción de kinurenina y de metabolitos intermediarios como el QUIN se incrementa considerablemente.

El QUIN se sintetiza en microglia y macrófagos en el cuerpo estriado en cerebros de mamíferos a través de la 3-hidroxiantranilato oxigenasa; los niveles extracelulares de QUIN durante una inflamación neuronal son tan altos que promueven la excitotoxicidad (Lehmann et al., 2001; Obrenovitch, 2001). Los astrocitos, tipo celular de sostén en el sistema nervioso central, presentan un papel protector al minimizar la producción de QUIN y maximizando la síntesis de ácido kinurénico; se sabe que, en el cuerpo estriado de rata, el ácido kinurénico antagoniza los efectos neurotóxicos del QUIN (Foster et al., 1984; Guillemín et al., 2001)

2.3.1 Toxicidad

La estimulación del receptor para NMDA por QUIN en tejido estriatal de rata produce desórdenes metabólicos diversos tales como la reducción del consumo de O₂ mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y NAD, así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon et al., 1997). Entre otros efectos tóxicos en el cerebro destacan: la disminución de GABA, un incremento excesivo de las concentraciones de Ca²⁺ citosólico, estrés oxidativo neuronal, peroxidación de lípidos y muerte celular (Foster et al., 1983; During et al., 1989; Santamaría y Ríos, 1993). Además, reproduce el patrón de la pérdida de células neuronales característica de la EH (Bordelon et al., 1997; El-Defrawy et al., 1986).

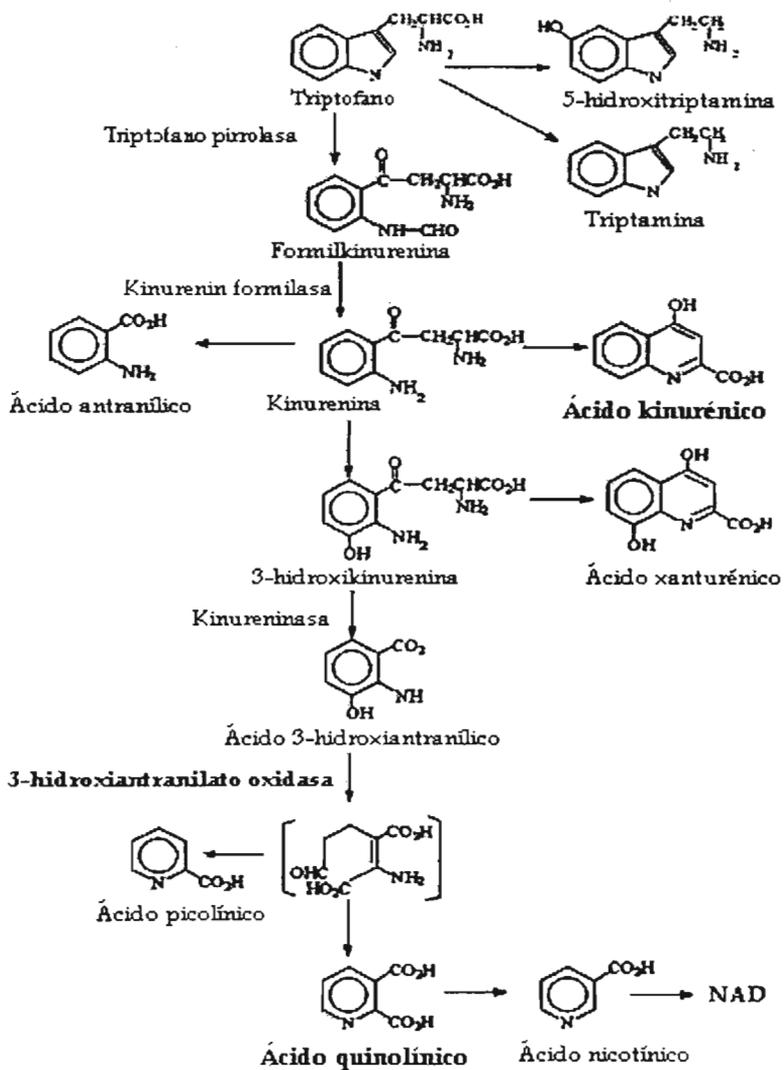


Figura 4. Vía de la kinurenina

Al QUIN se le ha asociado con cáncer (Harman, 1993) a través de la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Dado que se ha demostrado que el QUIN *per se* induce la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ *in vivo* en cuerpo estriado de rata (Santamaría et al., 2001). Recientes reportes en la literatura involucran al óxido nítrico (NO) en el daño inducido por QUIN, demostrándose en la habilidad del QUIN para producir peroxinitrito (ONOO^\cdot) en el cuerpo estriado de ratas en un tiempo de 24 hrs. (Ryu et al., 2004) o incluso días (Noack et al., 1998). Las causas de la presencia de estas especies aún no son claras, sin embargo se ha demostrado que el QUIN induce la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (ONSi), llevando a un aumento en los niveles de NO, y disminuyendo la actividad de la superóxido dismutasa (enzima destoxicante de O_2^\cdot).

2.4 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis, la óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce por una excesiva producción de especies reactivas y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño tanto al ADN como a proteínas y lípidos (Halliwell, 1992). Así mismo, puede ser la consecuencia de una disfunción en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Beal et al., 1995) o de la excitotoxicidad mediada por glutamato (Coyle y Puttfarcken, 1993).

Al parecer son tres las alteraciones intracelulares que de forma directa ocasionan el estrés oxidativo (Rice-Evans y Burdon, 1993):

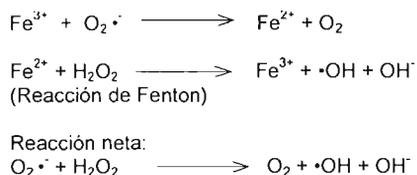
1. Sobreproducción de especies oxidantes como el H_2O_2 y de radicales libres, como el anión superóxido.
2. Descompartimentación de los complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica.
3. Disminución de defensas contra los radicales libres.

2.4.1. Radicales libres y especies reactivas

Un radical libre es una especie química capaz de existir de forma independiente, la cual contiene un electrón no apareado que puede formar enlaces covalentes, este electrón excedente hace al átomo muy reactivo. Un radical libre puede reaccionar con macromoléculas orgánicas, lo que puede conducir a daño celular, tisular, y consecuentemente, a una pérdida funcional (Halliwell y Gutteridge, 1985).

Se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO) principalmente al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), así como al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno es la cadena respiratoria. Los radicales libres derivados del oxígeno se producen normalmente en el cuerpo humano; parte de los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ se producen durante las reacciones de varias moléculas directamente con el oxígeno, por ejemplo: la adrenalina, dopamina, el tetrahidrofolato, los citocromos, etc. Además el superóxido también es producido por las células del sistema inmune: neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos.

La reacción de Haber-Weiss catalizada por el hierro, la cual hace uso de la reacción de Fenton, es considerada actualmente como el mecanismo principal por el cual el radical hidroxilo es generado en los sistemas biológicos (Kehrer, 2000).



Dentro de las especies reactivas de nitrógeno destacan el radical óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO^{\cdot}).

El NO es un neurotransmisor y un segundo mensajero que participa en algunos procesos fisiológicos tales como regulación del tono vascular, la neurotransmisión y la citotoxicidad celular (Pérez-Severiano et al., 1998). Una producción alterada de NO esta involucrada en diversas situaciones patofisiológicas, como la inflamación aguda y crónica,

aterosclerosis y daño renal. Así mismo, influye en la liberación de otros neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de cinasas de proteínas dependientes de GMPc, aumentando la fosforilación de las proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación de neurotransmisores. Lo más evidente es que el óxido nítrico se encuentra en la cadena que liga la activación de los receptores para glutamato del tipo NMDA a la liberación de neurotransmisor en la corteza cerebral o en el cuerpo estriado (Bogdaanov y Wurtman, 1997; Yun et al., 1996).

El peroxinitrito es una especie importante, causante de daño celular y presente durante situaciones de estrés oxidativo, y de él se hablará en el siguiente apartado.

El organismo tiene varios mecanismos de defensa para la inactivación de radicales libres ante una excesiva producción de éstos, a través de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, y la glutatión peroxidasa (GPx), responsables de la degradación del $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 respectivamente; así como a través de secuestradores de radicales libres y antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), el ácido ascórbico o vitamina C, el α -tocoferol o vitamina E (Halliwell y Gutteridge, 1984) y el β -caroteno, precursor de la vitamina A (Halliwell y Gutteridge, 1985; Beckman et al., 1990).

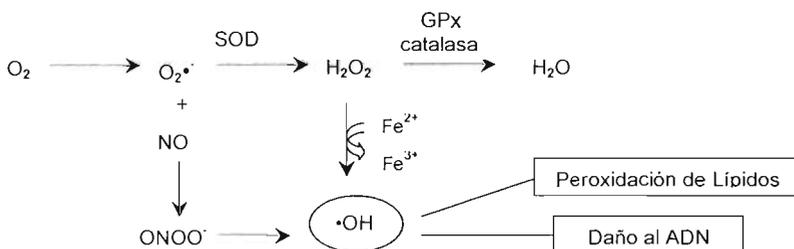


Figura 5. Simplificación de la generación de especies reactivas, consecuencias y algunos mecanismos de defensa.

2.5 PEROXINITRITO

El peroxinitrito (ONOO^-), formado por la reacción entre el óxido nítrico (NO) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), es un poderoso oxidante que está en equilibrio con su forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH). Ambas especies existen *in vivo*, predominando la forma aniónica a pH 7.4 y ambas especies tienen reactividades particulares sobre biomoléculas. Tanto la forma aniónica como la protonada de peroxinitrito son capaces de atravesar las biomembranas por diferentes mecanismos. El ONOOH tiene una vida media corta descomponiéndose para formar el radical $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ (Fig. 5). Por otro lado el ONOO^- es lo suficientemente estable como para permitir su difusión hacia otras células antes de descomponerse a $\bullet\text{OH}$ (Beckman et al., 1990). El $\bullet\text{OH}$ es extremadamente reactivo y el daño que provoca está limitado a un área cercana a su formación.

El peroxinitrito reacciona rápidamente con dióxido de carbono presente en sistemas biológicos conduciendo a la formación de radicales secundarios como radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$). Finalmente, una pequeña fracción de peroxinitrito se homolisa, dando lugar a la formación del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Fig. 6).

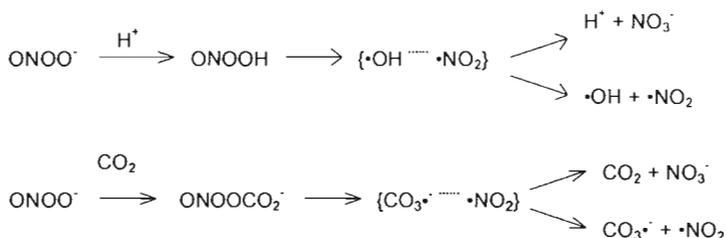


Figura 6. Rutas de descomposición del peroxinitrito en sistemas biológicos.

El peroxinitrito al reaccionar con el CO_2 forma un aducto (ONOOCO_2^-) de vida media corta el cual se isomeriza a nitrato y CO_2 produciendo 30-35% de los dos radicales, anión carbonato y dióxido de nitrógeno (Pietraforte et al., 2003).

2.5.1 Toxicidad

El peroxinitrito es particularmente efectivo oxidando moléculas aromáticas y compuestos organosulfurados, incluyendo aminoácidos libres y residuos peptídicos. La cisteína y el glutatión son compuestos relevantes como reservorios de antioxidantes y estos son convertidos a disulfuros (Szabó et al., 2002); la oxidación de grupos sulfhidrilos es responsable de la inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.

La mitocondria representa un blanco preferencial de las acciones tóxicas del peroxinitrito. Experimentos iniciales (Radi et al., 1994) mostraron que el peroxinitrito afecta varios componentes de la cadena de transporte mitocondrial, de la síntesis de ATP y la enzima ferro-sulfurada del ciclo de Krebs, aconitasa, causando una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP. Estos efectos a su vez tienen un impacto sobre la homeostasis mitocondrial y celular del calcio. Además la interacción del peroxinitrito con las mitocondrias puede determinar la señalización de procesos de muerte celular programada (apoptosis). Es conocido que concentraciones bajas de ONOO^- pueden disparar la muerte celular apoptótica, mientras que altas concentraciones pueden llevar a necrosis (Virág et al., 2003). Los procesos citotóxicos evocados por el peroxinitrito se resumen en la tabla 2.

Se ha encontrado que el peroxinitrito causa peroxidación de lípidos (malondialdehído y formación de dienos conjugados), daño al ADN por rupturas y desaminación de éste, inactivación de enzimas metabólicas clave como son aconitasa, ribonucleótido reductasa, succinato deshidrogenasa y citocromo oxidasa de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y reducción en las defensas antioxidantes, así como también puede nitrar proteínas con residuos de tirosina; mientras la reacción con grupos sulfhidrilos es directa con el ONOO^- , la nitración de tirosina probablemente esté asociada con la formación del catión nitrosonio (NO_2^+) intermediario. La detección de nitrotirosina es un marcador bioquímico confiable de la presencia de peroxinitrito en procesos patofisiológicos. Se ha encontrado nitrotirosina en tejidos de paciente con Alzheimer, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, sugiriendo un papel importante del ONOO^- en la patogénesis de estas enfermedades (Misko et al., 1998).

| Acción | Mecanismo |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>A nivel molecular</i> Inhibición de enzimas citosólicas. Inhibición de bombas de membrana. Inhibición de enzimas antioxidantes. Alteraciones en la transducción de señales. Daño al ADN Activación de metaloproteinasas. Agotamiento de enzimas antioxidantes Inhibición de enzimas dependientes de BH ₄ . Inhibición de enzimas dependientes de NAD ⁺ . | Oxidación, nitración Oxidación, nitración Oxidación, nitración Oxidación, nitración Oxidación, nitración, desaminación, formación de aductos. S-glutoxidación de pro-metaloproteinasas. Oxidación de glutatión y de cisteína. Oxidación de BH ₄ Oxidación de NADH. |
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>A nivel subcelular</i> Disfunción de la mitocondria. Agotamiento de NAD ⁺ . Sobre regulación de receptores de adhesión. Fragmentación de ADN. Deficiente regulación de calcio. | Inhibición de citocromos. Activación de PARP, oxidación directa de NAD ⁺ . Activación de NF-κB Daño al ADN, activación de caspasas. Deficiente funcionamiento de las bombas de calcio. |
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>A nivel celular</i> Necrosis. Apoptosis. | Daño mitocondrial, colapso energético, oxidación, nitración, agotamiento antioxidante, deficiente regulación de calcio. Daño mitocondrial, daño al ADN, activación de caspasas, disturbios en las señales de transducción, deficiente regulación de calcio. |

Tabla 2. Procesos citotóxicos evocados por el peroxinitrito

Diversos grupos se han abocado a definir la participación y rol de peroxinitrito en el desarrollo de patología, y los resultados disponibles sugieren la participación de esta especie en la patología neurodegenerativa (enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica), inflamación (articular, intestinal) y vascular (arterosclerosis), entre otras.

El desarrollo de una farmacología del peroxinitrito en la actualidad tiene un enfoque que implica la síntesis y evaluación de compuestos que reaccionen muy rápidamente con peroxinitrito y que a su vez genere productos no tóxicos. En este sentido, distintos grupos estudian un grupo de moléculas, la familia de las hierro- y manganeso-porfirinas. Las metaloporfirinas pueden funcionar como secuestradores catalíticos de peroxinitrito. Naturalmente, esta familia de productos y otros secuestradores de peroxinitrito deberán ser rigurosamente evaluados para su posible utilización en patología humana, pero abren desde ahora, una perspectiva promisoriosa (Radi, 2000).

2.6 METALOPORFIRINAS

Las vías de descomposición del peroxinitrito han llegado a ser motivo de importantes estudios, se ha publicado que la reacción del ONOO⁻ con dióxido de carbono provee una vía adicional para su descomposición, aunque esta vía es lenta con respecto a la difusión transmembranal y la reacción con centros metálicos. Desde que se demostró que el peroxinitrito reacciona muy eficientemente con centros metálicos biológicos, las metaloporfirinas han sido investigadas como catalizadores en la descomposición de peroxinitrito, surgiendo como una nueva clase de antioxidantes catalíticos que descomponen un rango amplio de especies reactivas de oxígeno como superóxido, peróxido, peroxinitrito y radicales peroxi lipídicos.

Factores como el tipo de centro metálico, potencial redox y carga electrostática de estos compuestos son reconocidos como determinantes importantes en su actividad antioxidante y potencia. Estos conceptos han guiado el desarrollo de metaloporfirinas con actividad específica más grande que la de las SOD nativas. Compuestos de esta clase han sido encontrados eficientes en una variedad de modelos de estrés oxidativo *in vivo* e *in vitro* de enfermedades humanas (Patel y Day, 1999). Porfirinas hidrosolubles de hierro y manganeso han presentado una alta reactividad con ONOO⁻ (Shimanovich y Groves, 2001), además de prevenir el daño oxidativo dependiente de NO en modelos animales y cultivos celulares. Recientemente han demostrado eficacia en modelos experimentales de isquemia (flujo sanguíneo insuficiente) (Mackense et al., 2001) y modelos de esclerosis lateral múltiple en ratones transgénicos (Wu et al., 2003).

En 1996, Stern y col. reportaron que la porfirina Fe(TMPyP) descompone el ONOO⁻ a nitrato; en el mismo año Szabó y col. reportaron que el Mn(TBAP) inhibe la oxidación mediada por el ONOO⁻ in vitro y que además previene la inhibición de la respiración mitocondrial en células expuestas a ONOO⁻. Estudios en animales han demostrado, por ejemplo, que una porfirina como el Fe(TMPS) reduce la nitración de residuos de tirosina evocados por peroxinitrito, no observándose protección utilizando el H₂TMPS, es decir la porfirina pero sin el metal; esto sugiere que la protección que proveen las metaloporfirinas se debe a la presencia del centro metálico (Misko et al. 1998).

2.6.1 Mecanismo de acción

Los porfirinatos de Mn(III) difieren fundamentalmente de los de Fe(III) en el agente reductor que utilizan, ya que el ascorbato es necesario para la reducción del intermediario oxo-Mn(IV) a Mn(III) para completar el ciclo (Fig. 6), mientras que las porfirinas de Fe(III) pueden descomponer el ONOO⁻ en ausencia de agentes reductores. Afortunadamente la reducción del oxo-Mn(IV) ocurre más rápido que la oxidación por peroxinitrito (Crow, 2000).

La reacción del ONOO⁻ con porfirinatos de Mn(III) produce un intermediario Mn(IV) y el radical dióxido de nitrógeno, y estas dos especies pueden oxidar moléculas que contengan residuos de tirosina, sin embargo el ascorbato puede limitar este evento mediante la reducción del Mn(IV) a Mn(III) y del •NO₂ a nitrato, regenerándose así la porfirina y completando el ciclo catalítico (ver figura 7).

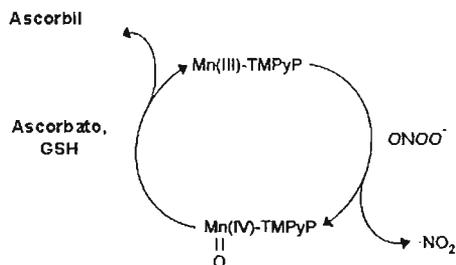


Figura 7. Mecanismo de reacción simplificado de la catálisis en la descomposición del peroxinitrito por porfirinas de Mn.

La catálisis por medio de porfirinatos de Fe(III) es vía un intermediario oxo-Fe(IV). La subsiguiente recombinación con $\bullet\text{NO}_2$ o con NO_2^- regenera el Fe(III) produciéndose nitrato (Fig. 8). La reacción del oxo-Fe(IV) con el $\bullet\text{NO}_2$ es más rápida comparada con la del NO_2^- . El $\bullet\text{NO}_2$ está en constante equilibrio con el N_2O_4 , el cual es disociado en NO_2^- y NO_3^- (Shimanovich y Groves, 2001).

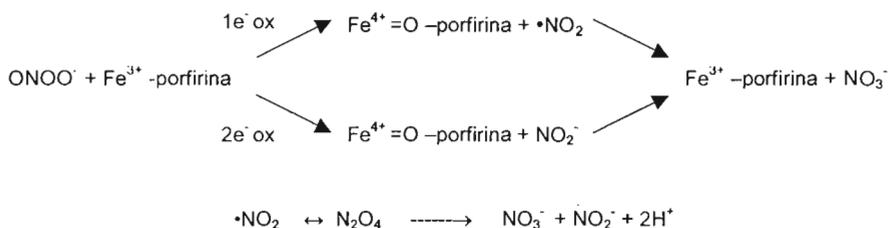


Figura 8. Descomposición de peroxinitrito por porfirinas de Fe(III).

2.6.2. 5,10,15,20-tetrakis (4'-fenilsulfonato) porfirinato de Fe(III) (Fe(TPPS))

El Fe(TPPS) (Fig. 9) es un poderoso catalizador de la descomposición de peroxinitrito, es soluble en agua y funciona catalizando la isomerización de ONOO^- exclusivamente a nitrato (Stern et al., 1996). Se ha determinado que juega un papel muy importante en la prevención de inflamaciones agudas (Salvemini et al., 1998) y que tiene efecto protector frente al ONOO^- generado endógenamente en células RAW 264.7 (macrófagos) y en cultivos de neuronas hipocámpales expuestas a citocinas (Misko et al., 1998).

De igual manera se ha probado en modelos de daño renal inducido por cisplatina donde provee protección y reduce la cantidad de nitrotirosina (Chirino et al., 2004). Un estudio reciente basado en la disfunción miocárdica reporta que el Fe(TPPS) está asociado a la reducción de la degradación de I κ B, inhibidor del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB) (factor involucrado en eventos de muerte celular apoptótica, entre otros); así como en la activación de macrófagos y en la reducción de los niveles plasmáticos del FNT- α , el cual inicia y magnifica el proceso de inflamatorio (Lancel et al., 2004).

En cuanto a su uso en modelos de neurotoxicidad este porfirinato ha sido utilizado en un modelo neurotóxico inducido por metanfetamina en el cual resultó ser totalmente protector contra la producción de peroxinitrito y contra la disminución dopaminérgica inducida por la metanfetamina (Imam et al., 2000); recientemente fue utilizado en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas, donde produjo neuroprotección al disminuir los niveles de ONOO⁻, 3-nitrotirosina, apoptosis y daño al ADN (Thiyagarajan et al., 2004).

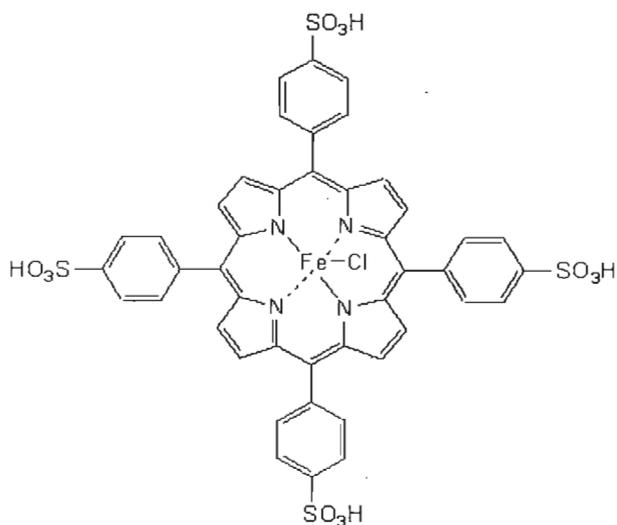


Figura 9. Fe(TPPS).

HIPÓTESIS

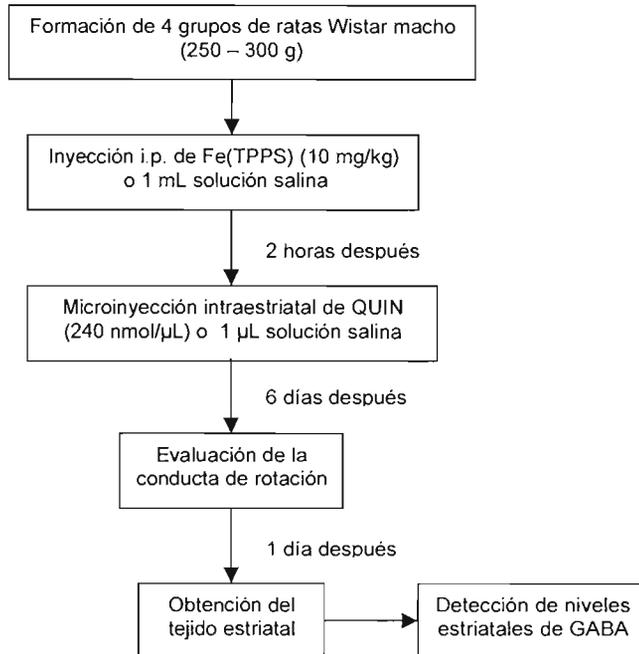
Si en el patrón de daño excitotóxico evocado por el QUIN está implicada la formación temprana de peroxinitrito, entonces al administrar un catalizador de la descomposición de esta especie, como lo es el Fe(TPPS), se prevendrá o atenuará el daño neuronal del QUIN evidenciado por los diferentes marcadores a probar.

OBJETIVOS

- ◆ Evaluar si la neurotoxicidad del QUIN está relacionada con la formación de ONOO⁻
- ◆ Evaluar los efectos del Fe(TPPS) como tratamiento sistémico en diferentes marcadores de neurotoxicidad inducida por el QUIN.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DIAGRAMA DE FLUJO



5.2 REACTIVOS Y ANIMALES

Se usó agua desionizada para la preparación de todos los reactivos y soluciones. Los reactivos fueron obtenidos de conocidas casas comerciales (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; E. Merck, México y J.T. Baker, México).

Se emplearon ratas Wistar machos (280-310 g), las cuales fueron obtenidas del Bioterio del I.N.N.N. Los animales tuvieron disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, y bajo condiciones constantes de luz, temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad.

5.3 CONDUCTA DE ROTACIÓN

- ◆ En lotes independientes de animales sometidos a los diferentes tratamientos, al sexto día de la administración i.e. de QUIN, los animales fueron administrados con apomorfina (APO) (2 mg/kg, s.c.) y se procedió a la evaluación conductual (Schwarcz et al., 1979; Norman et al., 1990).
- ◆ Cada animal fue separado y mantenido en forma individual en cajas de acrílico para su observación.
- ◆ Cinco minutos después, se registró el número total de giros ipsilaterales (en sentido del hemisferio lesionado) de cada animal durante 60 min. Cada rotación fue definida como un giro completo de 360° sobre sus patas traseras. La APO, como agonista dopaminérgico, produce una conducta de rotación característica de lesiones estriatales unilaterales; en este caso, los giros fueron ipsilaterales al lado lesionado, como se ha reportado (Susel et al., 1989; Santamaría y Ríos, 1993).
- ◆ Los resultados finales fueron expresados como No. de giros ipsilaterales /60 min.

5.4 NIVELES ESTRIATALES DE GABA

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

- Siete días después de la administración i.e. del QUIN, se administró un inhibidor de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD), el ácido 3-mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg, i.v.). Esto con la finalidad de prevenir un incremento *postmortem* de GABA en las muestras.
- Dos minutos después, se sacrificaron las ratas y se extrajo el estriado derecho.
- Se homogenizó el tejido en 15 volúmenes de metanol:agua (85%, v.v).
- Las muestras fueron centrifugadas durante 15 min. a 3 000 x g.

El análisis cromatográfico se realizó por HPLC con detección fluorométrica mediante una reacción de derivatización (Smith y Panico, 1985), empleando un programa de gradiente lineal de 10 a 65 % de metanol bajo las siguientes condiciones:

- A 100 μ l de sobrenadante se adicionaron 100 μ l de solución OPA (5 mg de OPA + 625 μ l de metanol + 5.6 ml de buffer de boratos 0.4 M (pH 9.5) + 25 μ l 2-mercaptoetanol) y se agitaron los tubos por 1 min, para generar la reacción (Fig. 10).
- Se inyectaron 20 μ l de la mezcla anterior en un cromatógrafo de líquidos BAS CC-5, el cual contenía una columna de fase reversa OPA-HS Alltech. La mezcla de gradiente consistió de solución buffer de acetato sódico 50 mM (pH 5.9) + 1.5% v:v de tetrahidrofurano y metanol grado HPLC. Se empleó un detector de fluorescencia BAS FL-45A.
- Los resultados finales fueron expresados en μ g GABA / g tejido fresco.

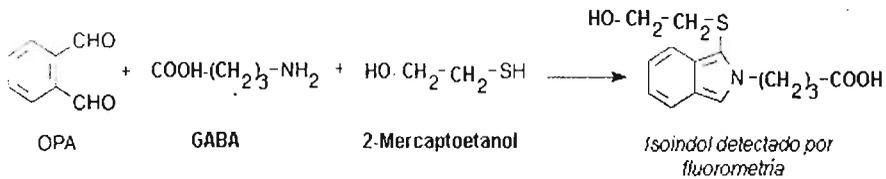
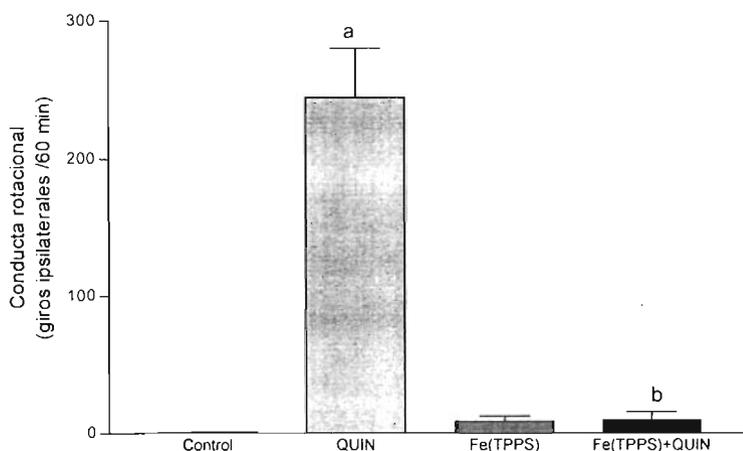


Figura 10. Reacción de derivatización con OPA

RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL Fe(TPPS) SOBRE LA CONDUCTA DE ROTACIÓN

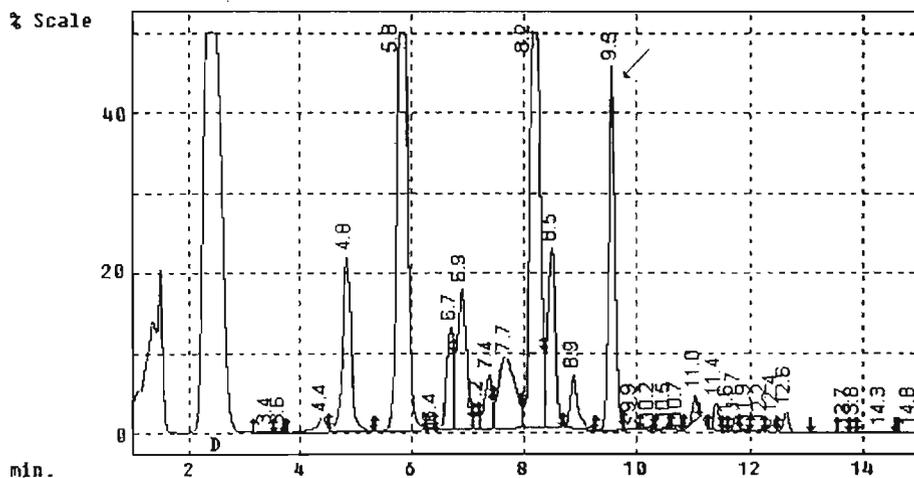
En la siguiente gráfica se muestra el efecto del Fe(TPPS) sobre la conducta de rotación inducida por QUIN. Los animales control mostraron irritabilidad y excitación después de la inyección de APO, como ha sido reportado, pero no mostraron conducta de rotación alguna. Los animales lesionados con QUIN presentaron un marcado número de giros después de la inyección de APO, mientras que los animales tratados con Fe(TPPS)+QUIN atenuaron significativamente la conducta de rotación inducida por la administración de APO.



Gráfica 1. Efecto de Fe(TPPS) en la conducta de rotación inducida por QUIN en ratas. Los animales recibieron un pretratamiento con Fe(TPPS) (10 mg/kg i.p.) o vehículo i.p. 120 min antes de la inyección unilateral de QUIN (1 μ l, 240 nmol) o vehículo en el estriado derecho. Seis días después se administró APO (2 mg/kg, s.c.) midiéndose la conducta rotacional por 60 min. Valores promedio \pm SEM de 5-6 ratas; ^aP<0.01 vs control, ^bP<0.01 vs QUIN. Kruskal-Wallis ANOVA seguido de la prueba U Mann-Whitney.

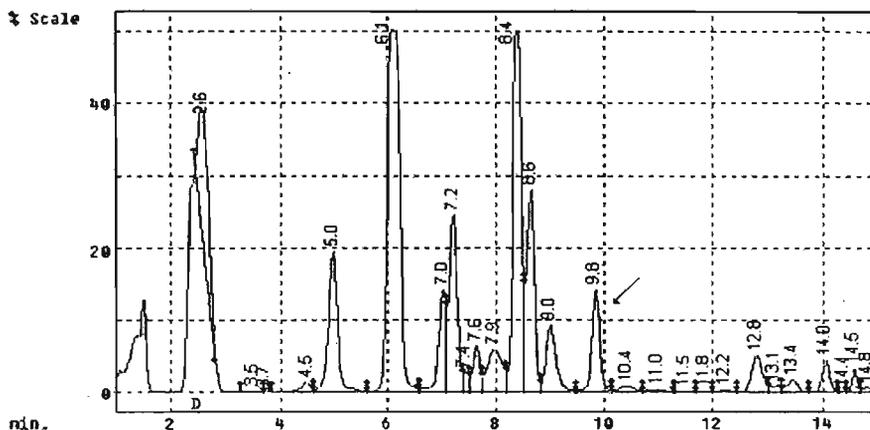
6.2 EFECTO DEL Fe(TPPS) SOBRE LOS NIVELES ESTRIATALES DE GABA

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos en detección de GABA estriatal, donde se observa claramente la disminución en la magnitud del pico respecto al control (con un tiempo de retención de aproximadamente 10 minutos, el cual corresponde al aminoácido de interés), en el tratamiento correspondiente a QUIN, y la parcial recuperación en el pre-tratamiento con el porfirinato.



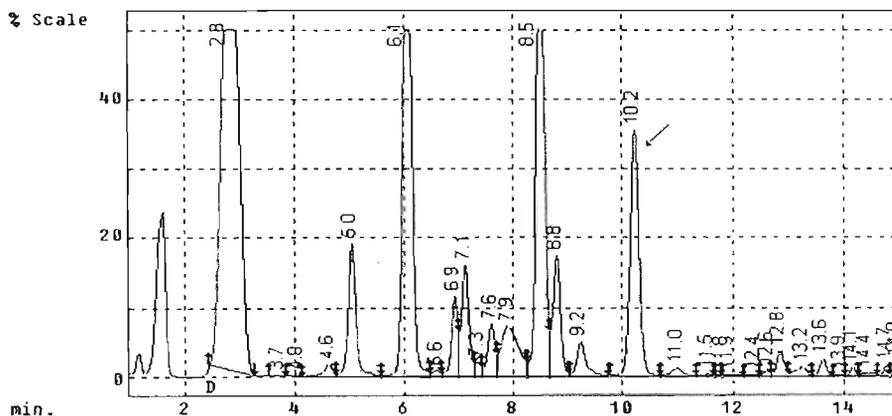
Cromatograma 1. CONTROL

El pico señalado corresponde a GABA en el tratamiento control (niveles basales).



Cromatograma 2. QUIN

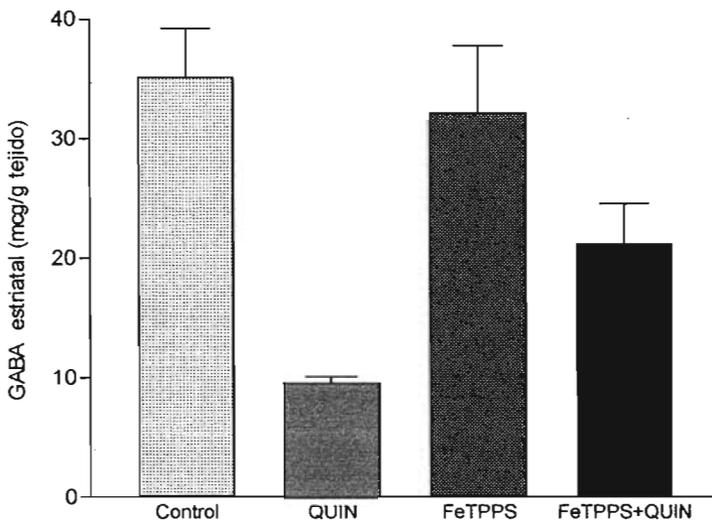
El pico señalado corresponde a GABA en el tratamiento con QUIN (1 μ l, 240 nmol). Se observa la disminución en la magnitud de dicho pico, comparándolo con el tratamiento control.



Cromatograma 3. Fe(TPPS) + QUIN

El pico señalado corresponde a GABA en el pre-tratamiento con Fe(TPPS) (10 mg/kg i.p.) y posterior infusión estriatal de QUIN (1 μ l, 240 nmol, 120 min. después). Destaca el aumento en la magnitud de dicho pico comparándolo con el tratamiento de QUIN.

En la siguiente gráfica se muestra el efecto del Fe(TPPS) sobre los niveles estriatales de GABA. El QUIN produjo una disminución significativa en los niveles de GABA, mientras que el Fe(TPPS) atenuó de manera parcial el efecto del QUIN incrementando su valor. Respecto al tratamiento de Fe(TPPS), no se aprecia diferencia alguna comparándolo con los niveles basales de GABA.



Gráfica 2. Efecto de Fe(TPPS) en los niveles estriatales de GABA en ratas.

Los animales recibieron un pretratamiento con Fe(TPPS) (10 mg/kg i.p.) o vehículo i.p. 120 min. antes de la inyección unilateral de QUIN (1 μ l, 240 nmol) o vehículo en el estriado derecho. Siete días después se administró 3-AMP (1.2 mmol/kg, i.v.) midiéndose los niveles estriatales por método cromatográfico. Valores promedio \pm SEM de 5-8 ratas; ^aP<0.01 vs control, ^bP<0.01 vs QUIN. ANOVA simple seguido de la prueba de Tukey.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo presenta evidencias de la efectividad catalítica *in vivo*, que posee el catalizador de peroxinitrito, Fe(TPPS).

Entre los resultados obtenidos, se encuentra una tendencia hacia la protección sobre los niveles de GABA, donde apreciamos una disminución de aproximadamente 25% en los niveles estriatales de este neurotransmisor en animales tratados con QUIN respecto al grupo control. El pre-tratamiento con el porfirinato produjo una prevención parcial a la disminución de GABA inducida por QUIN (60% respecto al control y 220% respecto a QUIN). Una evidencia más clara del efecto protector del porfirinato ante el daño por el QUIN, se encuentra en la conducta de rotación debido a que es un parámetro integrativo y global del daño por QUIN donde se involucra la función de los ganglios basales a nivel periférico y que se refleja en la conducta del animal (Norman et al., 1990). Esta evaluación permite poner de manifiesto un daño más extenso. Apreciándose así, una disminución marcada en la conducta de rotación, ya que las ratas tratadas con QUIN giran alrededor de 250 vueltas en promedio, mientras que las ratas pre-tratadas con Fe(TPPS)+QUIN disminuyen este número de giros en un 90%, lo que sustenta su efectividad.

Dichos resultados concuerdan con reportes que sugieren que la formación de ONOO⁻ dispara eventos de muerte neuronal apoptóticos y necróticos (Noack et al., 1998), resultando en daño neuronal en el estriado e incrementando la conducta de rotación en animales lesionados con QUIN, debido a un desbalance en la transmisión dopaminérgica entre el hemisferio lesionado y el no lesionado (Santamaría et al., 2003). Por otra parte, la acción preventiva del Fe(TPPS) en la conducta de rotación inducida por QUIN es indicativa de un alto grado de preservación celular producido por esta metaloporfirina a través de la temprana descomposición de ONOO⁻.

Mientras tanto, la disminución de los niveles de GABA inducida por QUIN es representativa de muerte de células GABAérgicas (Santamaría et al., 2003a) un efecto que parece estar relacionado parcialmente a la toxicidad mediada por el ONOO⁻, evidenciado por la relativa preservación del contenido de GABA en animales tratados con Fe(TPPS). La preservación parcial de los niveles de GABA se atribuye a la temprana descomposición del ONOO⁻, considerando que el QUIN es capaz de desencadenar eventos oxidativos y excitotóxicos en el cuerpo estriado en una etapa temprana de

neurotoxicidad aguda, generándose especies altamente reactivas, tales como el radical hidroxilo (Santamaría et al., 2001), el cual puede provenir de la ruptura del ONOO^- , siendo responsables de procesos bioquímicos y moleculares que llevan a la muerte celular.

Se ha encontrado evidencia de que el daño causado por el QUIN involucra procesos oxidativos, así mismo se sugiere la contribución de microglia y astrocitos en la neurodegeneración, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta al QUIN (Ryu et al., 2004). Por otra parte, no se ha aclarado la controversia acerca del posible involucramiento del óxido nítrico en los eventos neurotóxicos evocados por el QUIN, así la evidencia de la formación temprana de ONOO^- representa una alternativa de la toxicidad del óxido nítrico. Adicionalmente, el QUIN puede modificar la actividad de la óxido nítrico sintetasa enzima responsable de la formación del óxido nítrico, ya que se ha reportado que la óxido nítrico sintetasa inducible estriatal aumenta después de una infusión de QUIN (Schmidt et al., 1995) y que la activación contribuye a la muerte neuronal en ratones transgénicos de la línea R6/2, modelo experimental de la enfermedad de Huntington (Chen et al., 2000). Es de notar que la óxido nítrico sintetasa neuronal también incrementa su actividad después de una inyección intraestriatal de QUIN (Schmidt et al., 1995) y que ratones modificados genéticamente para no expresar la óxido nítrico sintetasa neuronal muestran resistencia a la excitotoxicidad (Ayata et al., 1997). Recientes investigaciones reportan la función de óxido nítrico sintetasa neuronal es alterada durante la progresión de la enfermedad en ratones transgénicos de la línea R6/2, modelo experimental para la EH (Pérez-Severiano et al., 2002), soportando la posibilidad de que un mal funcionamiento en la óxido nítrico sintetasa este involucrado en la patogénesis de la enfermedad de Huntington.

De igual manera, la actividad de la superóxido dismutasa, enzima detoxificante de $\text{O}_2^{\cdot-}$, muestra cambios ante una infusión de QUIN, reportándose que la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn es disminuida después de un tratamiento con QUIN (Santamaría et al., 2003b). De esta manera, existen las condiciones necesarias para la producción de ONOO^- y por tanto nos hace pensar en que este ión es responsable de forma parcial en la neurotoxicidad del QUIN. Este trabajo provee evidencia que sustenta dicha hipótesis. Aunado a esto se ha demostrado que el QUIN incrementa la expresión de 3-nitrotirosina (Ryu et al., 2004; Santiago-López et al., 2004), principal biomarcador de la formación de peroxinitrito.

El entendimiento del rol que juega el peroxinitrito en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas humanas conducirá al desarrollo de terapias racionales para la intervención farmacológica oportuna y proporcionará bases para el mejor entendimiento de los procesos patológicos del sistema nervioso central.

Por otra parte, en consideración de una respuesta positiva evocada por el Fe(TPPS) en el modelo de la enfermedad de Huntington producido por QUIN, este agente es un candidato prometedor para ser empleado en ensayos con modelos experimentales neurodegenerativos. Sin embargo, las propiedades químicas y biológicas de este compuesto requieren de más investigaciones.

CONCLUSIÓN

La administración intraestriatal de QUIN modificó los marcadores de daño neuronal probados en el estudio, mientras que el Fe(TPPS) mostró efecto protector al abatir la conducta rotacional, así como prevenir la disminución estriatal de GABA inducidas por QUIN en ratas, sugiriéndose un mecanismo de protección antioxidante temprana a través de la desactivación del peroxinitrito.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se probaron los efectos de un agente catabolizador de la descomposición de ONOO⁻, el porfirinato Fe(TPPS), sobre dos eventos neurotóxicos producidos por el QUIN *in vivo*, presumiéndose que la degradación temprana del ONOO⁻ reduce la neurotoxicidad estriatal del QUIN. Sin embargo, no se describe posibles mecanismos específicos de toxicidad involucrados en la formación del ONOO⁻, por lo que un estudio más detallado sobre dichos mecanismos y sobre aquellos de neuroprotección generados por los porfirinatos de hierro aún es necesario, por lo que se propone realizar estudios mas detallados dentro de los que destacan:

- Niveles estriatales de **3-nitrotirosina**, ya que es considerada como biomarcador de la formación de peroxinitrito.
- Medición de la actividad de la **caspasa-3**, para saber si el daño temprano causado por el QUIN paso por un proceso apoptótico o por otros mecanismos.
- Fragmentación internucleosomal de **ADN** estriatal, esta técnica servirá para discernir entre muerte celular por apoptosis o necrosis, y si existe un daño temprano al ADN.
- Expresión inmunohistoquímica de **FNT- α** , la cual dará evidencia de un daño mediado por citocinas proinflamatorias.
- Colocalización (técnica inmunohistoquímica) de la **ONSi** con **GFAP**, la ONSi da evidencia de la sobreproducción de óxido nítrico, reactivo para la formación de peroxinitrito; GFAP refleja la expresión de astrocitos, evidenciando que existe muerte neuronal, en tanto que la colocalización nos mostrará que esto esta sucediendo al mismo tiempo.

BIBLIOGRAFIA

- Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Penney JB, Young AB (1990). Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. *Ann Neurol* 27(4):357-65.
- Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ, Endres M, Kim A, Christie RH, Waeber C, Huang PL, Hyman BT, Moskowitz MA (1997). Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* 17:6908-6917.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Schwarcz KJ, Martin JB (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beal MF (1995). Metabolic disorders and neurotoxicology. *Curr Opin Neurol* 8:467-468.
- Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.
- Bogdanov MB, Wurtman RJ (1997). Possible involvement nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 221:197-201.
- Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecinska M (1997). Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69(4):1629-1639.
- Bruyn GW (1968). Huntington's chorea. Historical, clinical and laboratory synopsis. *Handbook of clinical neurology*. Vol 6, Diseases of the basal ganglia (Vinken P.J. Bruyn G.W., eds), pp 298-378. Amsterdam. North Holland.
- Bruyn RPM and Stoof JC (1990). The quinolinic acid hypothesis in Huntington's Chorea. *J Neurol Sci* 95:29-38.
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6:797-801.
- Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri (2004). Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 30;4(1):20.
- Conneally PM (1984). Huntington's disease: Genetics and epidemiology. *Am J Hum Genet* 36:506-526.
- Coyle JT and Puttfarcken P (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.

- Crow JP (2000). Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radic Biol Med* 28:1487-1494.
- Dávila JC (2004). NMDA, un receptor polifacético. Encuentros en la Biología. Universidad de Málaga. España. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros83/nmda>.
- During MJ, Heyes MP, Freese A, Markey SP, Martin JB, Roth RH (1989). Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading. *Brain Res* 476:384-387.
- El-Defrawy SR, Boegman RJ, Jhamandas K, Beninger RJ (1986). The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol* 64(3):369-375.
- Foster AC, Collins JF, Schwarcz R (1983). On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacol* 22:1331-1342.
- Foster AC, Vezzani A., French ED, Schwarcz R (1984). Kinurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett* 48(3):273-278.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ (2001). Kinurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78(4):842-853.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked Huntington's disease. *Nature* 306:234-328.
- Gusella JF and MacDonald ME (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nature Rev* 1:109-115.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 2129:1-4.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8:89-193.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
- Hannan A (2004). Molecular mediators, environmental modulators and experience-dependent synaptic dysfunction in Huntington's disease. *Acta Biochim Pol* 51:415-430.
- Harman D (1993). Free radicals and age-related diseases. In *Free Radicals in Aging* (de. Pal Y.B.), C.R.C. Press USA, 205-222.
- Harper PS (1996). The natural history of Huntington's disease. Pages 123-136, in Harper PS (ed), *Huntington's disease 2nd ed*, WB Saunders, London.

- Imam ZS, Islam F, Itzhak Y, Slikker W, Ali FS (2000). Prevention of dopaminergic neurotoxicity by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the prevention of methamphetamine-induced neurotoxic damage. *Brain Res* 837:15-21.
- Kehrer JP (2000). Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62:235-6
- Kornhuber J and Weller M (1997). Psychogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry* 41:135-144.
- Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marecha X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R (2004). Peroxynitrite decomposition catalyst prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol* 43:2348-2358.
- Lehrman E, Molinari A, Speciale C, Swarcz R (2001). Immunohistochemical visualization of newly formed quinolinate in the normal and excitotoxically lesioned rat striatum. *Exp Brain Res* 141(3):389-397.
- Mackensen GB, Patel M, Sheng H, Calvi CL, Batinic-Haberle I, Day BJ, Liang LP, Fridovich I, Crapo JD, Peralstein RD, Warner DS (2001). Neuroprotective from delayed postischemic administration of a metalloporphyrin catalytic antioxidant. *J Neurosci* 21:4582-4592.
- Martin JB and Gusella JF (1986). Huntington's disease: pathogenesis and management. *N Engl J Med* 315:1267-1276.
- McMurray CT (2001). Huntington's disease: new hope for therapeutics. *Trends Neurosci* 24:532-538.
- Misko PT, Highkin KM, Veenhuizen WA, Manning TP, Stern KM, Currie GM, Salvemini D (1998). Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem* 273:15646-15653.
- Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, Wolf G (1998). Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neural and glial compartments in the course of excitotoxically mediated degeneration: relation to oxidative and nitroergic stress. *Glia* 23:285-297.
- Norman AB, Wyatt LM, Hildebrand JP, Kolmonpunporn M, Moody CA, Lehman MN and Sanber PR (1990). Sensitization of rotation behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine or kainic acid-induced striatal lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 37:755-759.
- Obrenovitch TP (2001). Quinolinic acid accumulation during neuroinflammation. Does it imply excitotoxicity?. *Ann NY Acad Sci* 939:1-10.
- Pasantés H, Tapia R, Arias C (2000). Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 58-71.

- Patel M and Day BJ (1999). Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trend Pharmacol Sci* 20:359-364.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Ríos C (1998). Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinic acid-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* 23:1297-1302.
- Pérez-Severiano F and Ríos C (2000). Enfermedad de Huntington. Series del Inst. Nac. de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". pp. 67.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Ríos C, Segovia J (2002). Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res* 951(1):36-42.
- Pietraforte D, Salzano AM, Marino G, Minetti M (2003). Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* 25:341-350.
- Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95.
- Radi R (2000). Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas de Fisiología* 6:123-130.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(15):5733-7.
- Rice-Evans C and Burdon R (1993). Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110.
- Richfield EK, O'Brien CF, Eskin T, Shoulson (1991). Heterogeneous dopamine receptor changes in early and late Huntington's disease. *Neurosci Lett* 132:121-126.
- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG (2004). Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 187:150-159.
- Salvemini D, Wang Z, Stern KM, Currie GM, Misko T (1998). Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Pharmacology* 95:2659-2663.
- Santamaría A and Ríos C (1993). MK-801 an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159:51-54.
- Santamaría A, Ríos C, Solís-Hernández F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso L, Altgracia M, Kravtsov J (1996). System DL-kynurenic acid and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacol* 35:23-28.

- Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S (2001). In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *NeuroReport* 12:2693-2696.
- Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville ME, Ali SF (2003a). Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vivo and in vitro studies. *J Neurochem* 86:479-488.
- Santamaría A, Flores-Escartín A, Martínez JC, Osorio L, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos O, Jiménez-Capdeville ME, Manjarrez J, Rios C (2003b). Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radic Biol Med* 35(4):418-427.
- Santiago-López D, Vázquez-Román B, Pérez-de la Cruz V, Barreda D, Rembao D, Salinas-Lara C, Pedraza-Chaverri J, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A (2004). Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54:233-238.
- Schmidt W, Wolf G, Calka J, Schmidt HH (1995). Evidence for bidirectional changes in nitric oxide synthase activity in the rat striatum after excitotoxically (quinolinic acid) induced degeneration. *Neuroscience* 67(2):345-356.
- Schwarcz R, Fuxe K, Agnati L, Hockfelt T, Coyle JT (1979). Rotational behavior in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: A behavioral model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* 170:485-495.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-319.
- Shimanovich R and Groves JT (2001). Mechanisms of peroxynitrite decomposition catalyzed by FeTMPS, a bioactive sulfonated iron porphyrin. *Arch Biochem Biophys* 387(2):307-317.
- Shoulson I (1984). Huntington disease: a decade of progress. *Neurol Clin* 2:515-526.
- Sipione S and Cattaneo E (2001). Modeling Huntington's disease in cells, flies, and mice. *Mol Neurobiol* 23:21-51.
- Spiegel R (1995). Huntington's chorea: clinical aspects, genetics and current diagnosis. *Ther Umsch* 52(12):814-20.
- Smith RJ and Panico KA (1985). Automated analysis of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography. *Liquid Chrom* 8:1783-1795.
- Stern MK, Jensen MP, Kramer K (1996). Peroxynitrite decomposition catalysts. *J Am Chem Soc* 118:8735-8736.

- Stone TW and Connick JH (1985). Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience* 15(3):597-617
- Susel Z, Engber TM, Chase TN (1989). Behavioral evaluation of the antiexcitotoxic properties of MK-801: comparison with neurochemical measurements. *Neurosci Lett* 104: 125-129.
- Szabó C, Day BJ, Salzman AL (1996). Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381:82-86.
- Szabó C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacer P, Virág L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT (2002). Part I: Pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med* 8:571-580.
- Thiyagarajan M, Kaul CL, Sharma SS (2004). Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalyst in focal cerebral ischemia in rats. *Br J Pharmacol* 142(5):899-911.
- Tobin AJ and Signer ER (2000). Huntington's disease: the challenger for cell biologists. *Trends Cell Biol* 10(12):531-536.
- Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141:113-124.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.
- Whetsell WO Jr and Shapira NA (1993). Neuroexcitation, excitotoxicity and human neurological disease. *Lab Invest* 68(4):372-87.
- Wu AS, Kiaei M, Aguirre N, Crow JP, Calingasan NY, Browne SE, Beal MF (2003). Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 85:142-150.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10:291-316.
- Zoghbi H and Orr HT (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Ann Rev Neurosci* 23:217-247.