

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“POSIBLE CONTRIBUCIÓN DEL PEROXINITRITO EN LA  
NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR ÁCIDO QUINOLÍNICO, UN  
MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE  
HUNTINGTON”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A :**

**Q.F.B. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2007



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto ("Posible contribución del peroxinitrito en la neurotoxicidad inducida por ácido quinolínico, un modelo experimental de la enfermedad de Huntington", N. de becario 194044) y la obtención del grado correspondiente.

Al Comité Tutorial conformado por: Dr. Abel Santamaría Del Angel, Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes y Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca por sus valiosos comentarios a lo largo del desarrollo de este trabajo, por su guía y su legítimo interés por este trabajo.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y el Dr. José Pedraza Chaverri por sus atinados comentarios a la tesis.



## INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. ABREVIATURAS .....   | 1  |
| 2. RESUMEN .....  | 3  |
| 2.1 ABSTRACT.....   | 4  |
| 3. INTRODUCCIÓN.....  | 5  |
| 3.1 Excitotoxicidad .....   | 5  |
| 3.2 Receptores glutamatérgicos .....  | 6  |
| 3.2.1 Receptores para N-metil-D-aspartato.....                                    | 8  |
| 3.2.1.1 Mecanismos de excitotoxicidad dependiente del receptor<br>para NMDA ..... | 10 |
| 3.3 Vía de la kinurenina .....  | 11 |
| 3.3.1 Metabolismo de la vía de la kinurenina.....                                 | 11 |
| 3.3.2 Metabolitos neuroactivos de la vía .....                                    | 13 |
| 3.3.3 Kinureninas endógenas y disfunción cerebral .....                           | 14 |
| 3.4 Ácido quinolínico (QUIN) .....  | 16 |
| 3.4.1 Daño excitotóxico .....   | 16 |
| 3.4.2 Daño oxidativo .....  | 17 |
| 3.4.3 Alteraciones energéticas .....  | 20 |
| 3.4.4 QUIN y Conducta .....   | 21 |
| 3.4.5 Alteraciones Morfológicas .....   | 22 |
| 3.4.6 QUIN e Inflamación .....  | 23 |
| 3.4.7 Apoptosis vs. Necrosis .....  | 24 |
| 3.4.8 Implicaciones del QUIN en diversas patologías .....                         | 26 |
| 3.4.8.1 Enfermedad de Huntigton .....   | 26 |
| 3.4.8.2 Decline cognitivo .....   | 27 |
| 3.4.8.3 Isquemia Cerebral .....   | 27 |
| 3.4.8.4 Daño traumático .....   | 28 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.4.8.5 | Epilepsia .....  | 28 |
| 3.4.8.6 | VIH y complejo SIDA-demencia .....                               | 28 |
| 3.4.8.7 | Enfermedad de Alzheimer .....                                    | 29 |
| 3.4.8.8 | Esquizofrenia .....  | 30 |
| 3.4.8.9 | Otras enfermedades inflamatorias .....                           | 30 |
| 3.5     | Estrés oxidativo y nitrosativo .....                             | 31 |
| 3.5.1   | Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno .....                  | 32 |
| 3.5.2   | Daño oxidativo .....   | 35 |
| 3.5.2.1 | Peroxidación de lípidos .....                                    | 35 |
| 3.5.3   | Antioxidantes endógenos y exógenos .....                         | 36 |
| 3.6     | Óxido nítrico .....  | 38 |
| 3.6.1   | Sintasas de óxido nítrico .....                                  | 39 |
| 3.7     | Peroxinitrito .....  | 41 |
| 3.7.1   | Formación .....  | 41 |
| 3.7.2   | Toxicidad .....  | 42 |
| 3.8     | Metaloporfirinas .....   | 45 |
| 3.8.1   | Generalidades .....  | 45 |
| 3.8.2   | Mecanismos de acción .....                                       | 46 |
| 3.8.3   | FeTPPS .....   | 48 |
| 4.      | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                 | 50 |
| 5.      | HIPÓTESIS .....  | 51 |
| 6.      | OBJETIVOS .....  | 52 |
| 7.      | MÉTODOS .....  | 53 |
| 7.1     | Materiales y Animales .....                                      | 53 |
| 7.2     | Obtención de sinaptosomas .....                                  | 53 |
| 7.3     | Peroxidación de lípidos <i>in vitro</i> .....                    | 53 |
| 7.4     | Estimación de la viabilidad mitocondrial .....                   | 54 |
| 7.5     | Diseño experimental para los experimentos <i>in vivo</i> .....   | 55 |
| 7.6     | Determinación de los niveles de 3-nitrotirosina .....            | 56 |
| 7.7     | Determinación de la actividad de la sintasa de oxido nítrico ... | 56 |
| 7.8     | Cuantificación de la actividad de la superóxido dismutasa ....   | 57 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 7.9      | Peroxidación de lípidos <i>in vivo</i> .....   | 58 |
| 7.10     | Estimación de la actividad de caspasa 3 .....  | 58 |
| 7.11     | Determinación del daño al ADN .....  | 59 |
| 7.12     | Diagrama de flujo para los experimentos <i>in vivo</i> .....   | 59 |
| 7.13     | Análisis estadístico .....   | 60 |
| 8.       | RESULTADOS .....   | 61 |
| 8.1      | Efecto del FeTPPS y del MnTBAP en la peroxidación lipídica inducida por el QUIN en sinaptosomas .....                          | 61 |
| 8.2      | La disfunción mitocondrial inducida por QUIN en sinaptosomas es atenuada por FeTPPS .....                                      | 62 |
| 8.3      | La formación de 3-NT estriatal inducida por QUIN es prevenida eficientemente por la descomposición del ONOO <sup>-</sup> ..... | 63 |
| 8.4      | Efecto del FeTPPS en la actividad de la superóxido dismutasa en ratas lesionadas con QUIN .....                                | 64 |
| 8.5      | La actividad estriatal de SON es afectada por QUIN y restablecida por el empleo del pre-tratamiento con FeTPPS.....            | 65 |
| 8.6      | La peroxidación lipídica estriatal inducida por QUIN es prevenida por la descomposición del ONOO <sup>-</sup> .....            | 66 |
| 8.7      | La inducción de la actividad de caspasa-3 <i>in vivo</i> por QUIN es reducida por el FeTPPS .....                              | 67 |
| 8.8      | Efecto del FeTPPS en el patrón de fragmentación de ADN inducido por QUIN .....   | 68 |
| 9.       | DISCUSIÓN .....  | 69 |
| 10.      | CONCLUSIONES .....   | 74 |
| 11.      | ANEXOS .....   | 75 |
| 11.1     | Ganglios basales .....   | 75 |
| 11.2     | Enfermedad de Huntington .....   | 76 |
| 11.2.1   | Antecedentes .....   | 76 |
| 11.2.2   | Alteraciones bioquímicas de la enfermedad de HD ...  | 77 |
| 11.2.3   | Alteraciones neuropatológicas .....  | 78 |
| 11.2.4   | Modelos experimentales de la enfermedad de HD ....   | 78 |
| 11.2.4.1 | Modelos excitotóxicos .....  | 79 |

|          |                                     |    |
|----------|-------------------------------------|----|
| 11.2.4.2 | Modelos de déficit energético ..... | 81 |
| 11.2.4.3 | Modelos transgénicos .....          | 83 |
| 12.      | BIBLIOGRAFÍA .....                  | 85 |

### 13. PUBLICACION

## 1. ABREVIATURAS

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ❖ ADN                           | Acido desoxirribonucléico                                   |
| ❖ AMPA                          | $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato    |
| ❖ BH <sub>4</sub>               | (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina                           |
| ❖ CaM                           | Calmodulina   |
| ❖ EROs                          | Especies reactivas de oxígeno                               |
| ❖ FeTPPS                        | 5,10,15,20-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirinato de Fe(III) |
| ❖ GABA                          | Ácido $\gamma$ -amino butírico                              |
| ❖ GluR                          | Receptor glutamatérgico                                     |
| ❖ iGluR                         | Receptor glutamatérgico ionotrópico                         |
| ❖ mGluR                         | Receptor glutamatérgico metabotrópico                       |
| ❖ 3-HAO                         | 3-Hidroxiantranílico dioxigenasa                            |
| ❖ HD                            | Enfermedad de Hungtinton                                    |
| ❖ 3-HK                          | 3-Hidroxikinurenina   |
| ❖ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno                                       |
| ❖ IBO                           | Ácido iboténico   |
| ❖ KAT                           | Kinurenina aminotransferasa                                 |
| ❖ KA                            | Ácido kaínico   |
| ❖ KYNA                          | Acido kinurénico  |
| ❖ L-KYN                         | L-Kinurenina  |
| ❖ MnTBAP                        | Tetrakis-(4-ácido benzoico)porfirinato de Mn(III)           |
| ❖ NAD <sup>+</sup>              | Nicotinamida adenina dinucleótido                           |
| ❖ NBT                           | Nitroazul de tetrazolio                                     |
| ❖ NMDA                          | N-metil-D-aspartato   |
| ❖ NMDAr                         | Receptor para NMDA  |
| ❖ NO                            | Óxido nítrico   |
| ❖ O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Anión superóxido  |
| ❖ •OH                           | Radical hidroxilo   |
| ❖ ONOO <sup>-</sup>             | Peroxinitrito   |
| ❖ ONOOH                         | Ácido peroxinitroso   |
| ❖ PL                            | Peroxidación de lípidos                                     |
| ❖ PPSE                          | Potencial postsináptico excitatorio                         |

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| ❖ QUIN | Ácido quinolínico                     |
| ❖ SOD  | Superóxido dismutasa                  |
| ❖ SON  | Sintasa de óxido nítrico              |
| ❖ SONc | Sintasa de óxido nítrico constitutiva |
| ❖ SONi | Sintasa de óxido nítrico inducible    |
| ❖ SONt | Sintasa de óxido nítrico total        |
| ❖ TDO  | Triptofano dioxigenasa                |

## RESUMEN

El ácido quinolínic (QUIN) es una excitotoxina que produce un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington en primates no humanos y roedores. Se sabe que el QUIN es un agonista glutamatérgico de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y causa degeneración en regiones específicas del cerebro. El QUIN genera sus efectos vía la sobreactivación de receptores para NMDA, produciendo neurotoxicidad a través de mecanismos de excitotoxicidad y daño oxidativo. Adicionalmente, se sabe que el QUIN es capaz de alterar las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (SOD) y de la sintasa de óxido nítrico (SON), dándonos como resultado una acumulación de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y un aumento en la producción de óxido nítrico (ON), y generando así el ambiente idóneo para la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) desde tiempos cortos después de su infusión. El principal blanco del  $ONOO^-$  para ejercer sus efectos tóxicos es la mitocondria. Es importante resaltar que el  $ONOO^-$  puede inhibir a la superóxido dismutasa, la glutarredoxina y otras moléculas y sistemas antioxidantes como el glutatión además de que también puede ocasionar daño a nivel genético por rupturas y desaminaciones del ADN y llevar así a la muerte celular apoptótica o necrótica, dependiendo de las concentraciones en las que éste se encuentre. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar el papel del  $ONOO^-$  en los eventos neurotóxicos evocados por el QUIN en Sistema Nervioso Central (SNC) de rata, a través del FeTPPS, una porfirina de hierro que cataliza la descomposición del  $ONOO^-$ . Se evaluaron diferentes concentraciones de FeTPPS sobre la peroxidación de lípidos (PL) y la viabilidad mitocondrial en fracciones sinaptosomales de cerebro expuestas al QUIN. Por otra parte, la formación de  $ONOO^-$  a través de los niveles de la 3-nitrotirosina (3-NT), las actividades enzimáticas de la sintasa de óxido nítrico (SON), la superóxido dismutasa (SOD) y la caspasa-3, así como la fragmentación de DNA, fueron todos evaluados en tejido estriatal de ratas lesionadas tópicamente con QUIN. Las concentraciones crecientes (10-800  $\mu M$ ) de FeTPPS disminuyeron la peroxidación de lípidos y la disfunción mitocondrial inducidas por QUIN (100  $\mu M$ ) en sinaptosomas de manera concentración-dependiente. El QUIN aumentó los niveles de 3-NT (biomarcador de la presencia de  $ONOO^-$ ) desde los primeros 60 min y el FeTPPS abatió los niveles de dicho marcador. El FeTPPS (10 mg/kg, i.p.), administrado 2 horas antes de la lesión estriatal, previno la formación de  $ONOO^-$ , la PL, y las alteraciones en las actividades de la SON y la SOD inducidas por QUIN (240 nmol/ $\mu L$ ) 120 minutos después de su infusión. La activación de caspasa-3 y la fragmentación de DNA fueron reducidas por FeTPPS 24 horas después de la lesión estriatal. Estos hallazgos sugieren la producción temprana de  $ONOO^-$  inducida por el QUIN, y demuestran los efectos neuroprotectores del FeTPPS sobre los procesos neurotóxicos, pro-apoptóticos y pro-oxidantes del QUIN *in vitro* e *in vivo* en este modelo experimental.

## ABSTRACT

Quinolinic acid (QUIN) is an excitotoxin that produces a pharmacological model of Huntington's disease in non human primates and rodents. It is known that QUIN is also a glutamate agonist acting on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor that causes degeneration of specific brain regions. QUIN generates toxic effects through the over activation of NMDA receptor, thus producing neurotoxicity by means of excitotoxicity and oxidative stress. In addition, QUIN is known to be able to affect the enzyme activities of superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide synthase (NOS), thereby leading to the accumulation of superoxide anion ( $O_2^-$ ) as well as an increase in the levels of nitric oxide (NO), and these to events contribute to a propitious environment for the formation of peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) since short times after the infusion of the toxin. The main target for the toxin actions of  $ONOO^-$  is the mitochondria. Of note,  $ONOO^-$  may inhibit SOD, glutaredoxin, and other molecules and antioxidant systems such as glutathione. Moreover,  $ONOO^-$  is responsible for causing damage to DNA by deamination, therefore producing apoptotic and/or necrotic cell death, depending on the concentrations at which this species is found. Given this information, the purpose of this work was to evaluate the role of  $ONOO^-$  in the neurotoxic events evoked by QUIN in the rat brain. We used FeTPPS, an iron porphyrin that catalyzes the  $ONOO^-$  decomposition, for investigating the involvement of this species in this paradigm. Different concentrations of FeTPPS were tested on the lipid peroxidation and the mitochondrial function in rat brain synaptosomal fractions exposed to QUIN. On the other hand, the  $ONOO^-$  formation was assessed by the measurement of 3-nitrotyrosine (3-NT) levels. The enzyme activities of NOS, SOD and caspase-3, as well as DNA fragmentation, were all evaluated in striatal tissue from QUIN-lesioned rats. Increasing concentrations (10-800  $\mu$ M) of FeTPPS decreased the lipid peroxidation and the mitochondrial dysfunction induced by QUIN (100  $\mu$ M) in synaptosomes in a concentration-dependent manner. QUIN also increased the levels of 3-NT (a current biomarker of the  $ONOO^-$  formation) since the first 60 min after the QUIN infusion, while FeTPPS, given as a pre-treatment to rats, completely abolished the 3-NT levels. Thus, FeTPPS (10 mg/kg, i.p.), administered 2 h before the striatal lesion, prevented the QUIN (240 nmol/ $\mu$ L)-induced formation  $ONOO^-$ , the lipid peroxidation and the changes in the activities of NOS and SOD. Caspase-3 activation and DNA fragmentation were also reduced by FeTPPS 24 h after QUIN injection. Altogether, these findings demonstrate the early formation of  $ONOO^-$  by QUIN and suggest the neuroprotective effects of FeTPPS on the neurotoxic, pro-apoptotic and pro-oxidant actions of QUIN under in vivo and in vitro conditions in the experimental model of Huntington's disease.

## INTRODUCCION

### 3.1 EXCITOTOXICIDAD

La excitotoxicidad neuronal involucra una elevación fisiológica de las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a una sobre-exposición de las células por acción de los aminoácidos excitadores, tales como el glutamato y el aspartato. Un disturbio en el influjo de calcio a través de receptores glutamatérgicos para N-metil-D-aspartato (NMDAr) puede potenciar vías metabólicas letales que involucran enzimas degradativas (proteína cinasas, fosfolipasas, sintasas de óxido nítrico, proteasas, etc.), daño mitocondrial e incremento en la formación de radicales libres (Rami et al., 1997), llevando así a la célula a una muerte apoptótica y/o necrótica.

La consideración de que las proteína cinasas pueden estar jugando un papel importante en la excitotoxicidad ha sido apoyado por observaciones en las que neuronas pre-tratadas con gangliósidos previenen la translocación de proteína cinasa C, reduce la duración de la carga de calcio inducida por el glutamato, y protege a las neuronas de la neurotoxicidad inducida por este aminoácido (Manev et al., 1990). Además, el que la activación de proteasas resulte en excitotoxicidad ha sido apoyado por estudios en donde inhibidores de calpaina reducen la pérdida neuronal isquémica en el hipocampo (Lee et al., 1991). Adicionalmente, el calcio puede jugar un papel fundamental en la disfunción mitocondrial, ya que la mitocondria tiene la capacidad de secuestrar calcio. Cuando esto ocurre, la disminución en el potencial de membrana es proporcional al calcio que entra a la mitocondria, y dicha acumulación puede a su vez resultar en el cese de la producción de energía (Nicotera et al., 1990). Otro mecanismo potencial de la neurotoxicidad del glutamato es la generación de segundos mensajeros como el óxido nítrico, después de la activación de NMDAr.

Estos mecanismos están involucrados tanto en desórdenes neurodegenerativos agudos (trauma) como crónicos (enfermedades de Alzheimer y Huntington) (Siesjo, 1981; Choi, 1988; Saito et al., 1993). Se sabe que en diversos modelos experimentales de excitotoxicidad hay un incremento de los niveles de calcio intracelular, al igual que producción de diversas especies reactivas del oxígeno como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). También se ha descrito un aumento en el actividad de la sintasa del óxido nítrico y en los niveles de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), una

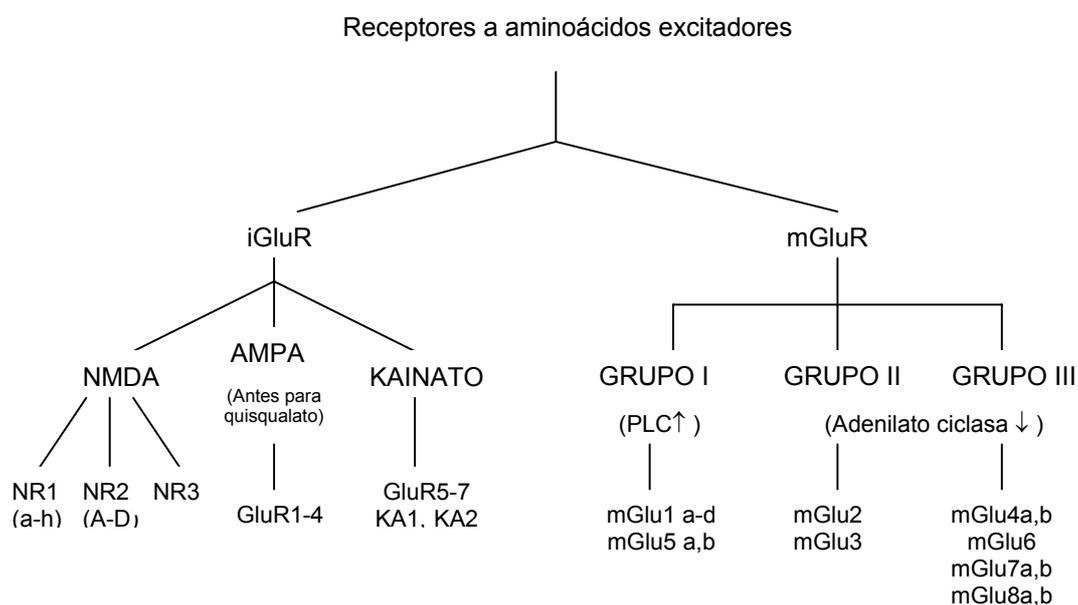
especie reactiva derivada del oxígeno y del nitrógeno capaz de causar muerte apoptótica o necrótica, dependiendo de la concentración en la que se encuentre (Virág et al., 2003).

Por otra parte la neurotoxicidad seguida de la exposición de neuronas a altas concentraciones de glutamato, puede ser dividida en dos fases que representan dos mecanismos diferentes de daño neuronal y muerte. La breve exposición a glutamato (5-15 min) lleva a la “hinchazón” de las neuronas, causa desintegración celular y libera lactato deshidrogenasa (Choi, 1987; Choi et al., 1988), mientras que la neurotoxicidad inducida después de la exposición prolongada (12-24hrs) a altas concentraciones de glutamato o análogos del NMDA, como el ácido quinolínico (QUIN) tiene dependencia estricta de las concentraciones de calcio extracelular. La toxicidad inducida después de los 30 min de la exposición a glutamato variando sus concentraciones consiste en la activación secuencial de cambios necróticos y apoptóticos (Ankarcrona et al., 1995). Concentraciones muy pequeñas de L-glutamato causan solamente muerte apoptótica caracterizada por la condensación de cromatina nuclear y la fragmentación internucleosomal del ADN por endonucleasas. Sin embargo, concentraciones micromolares y milimolares de glutamato inicialmente inducen “hinchazón” neuronal, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y disminución de la energía de las células. Muchas células mueren después de esta fase inicial y su muerte es típicamente necrótica, pero las neuronas que sobreviven recobran el potencial de la membrana mitocondrial y la energía metabólica y de esta manera estas células progresan a la segunda fase de muerte celular (apoptosis) (Ankarcrona et al., 1995)

### **3.2 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS**

El glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio en el SNC (Kew & Kemp, 2005). Las acciones del glutamato son mediadas vía la activación de receptores para glutamato (GluR), los cuales pueden dividirse en dos grandes familias: los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR) o regulados por ligando - en los cuales la molécula receptora también es un canal iónico -, y los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) - en los cuales el receptor y el canal iónico son moléculas separadas y los primeros modulan a los segundos por activación de moléculas intermediarias llamadas proteínas G.

Los receptores glutamatergicos ionotrópicos han sido divididos a su vez en tres subfamilias basadas en sus propiedades farmacológicas: el receptor AMPA, el receptor a kainato y el receptor para NMDA (ver tabla 1). Sus nombres derivan de los agonistas que los activan: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) y ácido kaínico. Los receptores AMPA/kainato también se denominan receptores no-NMDA. Otro tipo de receptor para el glutamato es el metabotrópico (mGluR), el cual modula los canales iónicos postsinápticos al activar a las proteínas G (Fig. 1).



**Fig. 1** Clasificación de los receptores glutamatergicos

Los iGluR son los que median las respuestas sinápticas rápidas por la apertura de canales iónicos, mientras que los mGluR son los que causan efectos sinápticos lentos y están asociados con cambios bioquímicos (Schoepp et al., 1999; Watkins & Jane, 2006). Los mGluR están asociados a proteínas G y comprenden tres grupos (Fig. 1): el Grupo I consiste de mGlu1 y mGlu5 los cuales activan a la fosfolipasa C y causan un incremento intracelular en la concentración de inositol trifosfato y la movilización de calcio, y los Grupos II (mGlu2 y mGlu3) y III (mGlu4,6,7, y 8) inhiben la actividad de la adenilato ciclasa resultando en una disminución en la concentración intracelular de AMPc.

Los receptores AMPA/kainato son responsables de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) más rápidos producidos por el glutamato. Al igual que otros

receptores de canales regulados por ligando, estos receptores están formados por varias subunidades de proteínas que pueden reunirse de diferentes maneras para producir una amplia gama de tipos de receptores. Recientemente, para estos receptores se ha propuesto un ensamblaje pentamérico de varias subunidades (Werner et al., 1991) y se ha sugerido que una segunda región transmembranal de las subunidades respectivas forma el poro del canal (Jorgensen et al., 1995). El poro central formado por estas subunidades permite la entrada y salida de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ , y en algunos casos de pequeñas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$ .

| <i>Familia de receptores</i> | <i>Subfamilia</i> | <i>Subtipo</i>     | <i>Acción primaria</i>                    | <i>Agonistas</i>   | <i>Antagonistas</i>   |
|------------------------------|-------------------|--------------------|---|--|---|
| Ionotrópico                  | NMDA              |                    | ↑ $[\text{Ca}^{2+}]$<br>↑ $[\text{Na}^+]$ | NMDA, QUIN, HCA, L-glutamato, L-aspartato, glicina, espermina, espermidina | AP5, AP7, CGS197555, KYNA, HA-966, PCP, MK-801, $\text{Mg}^{2+}$ , efenprodil, eliprodil, $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ . |
|                              | AMPA/Kainato      |                    | ↑ $[\text{Na}^+]$                         | Kainato, AMPA, QUIS, DOM, L-glutamato.                                     | CNQX, NBQX, GYK152466   |
| Metabotrópico                | Grupo I           | mGluR1<br>mGluR5   | ↑ PI                                      | 3-HPG<br>DHPG  | UPF531,<br>4-CPG  |
|                              | Grupo II          | MGluR2<br>mGluR3   | ↓ AMPc                                    | Trans-MCG-1,<br>DCG-IV,<br>4C3HPG  | MCCG  |
|                              | Grupo III         | mGluR4<br>mGluR6-8 | ↓ AMPc                                    | L-AP4, L-SOP   | MPPG  |

**Tabla 1.** Receptores para aminoácidos excitadores y sus principales agonistas y antagonistas.

### 3.2.1 RECEPTORES PARA N-METÍL-D-ASPARTATO

La subfamilia de los receptores NMDA (NMDAr) para glutamato también forma canales iónicos selectivos a cationes con múltiples subunidades similares a la mayoría de

los otros receptores con canales iónicos regulados por ligando. Sin embargo, los NMDAr poseen algunas propiedades funcionales únicas que los tornan especialmente interesantes. Tal vez lo más importante de ellos es el hecho de que los canales iónicos de los NMDAr permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  además de cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . En consecuencia, los PPSE producidos por los NMDAr pueden aumentar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la neurona postsináptica; entonces el cambio de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar como segundo mensajero para activar cascadas de señalización intracelular. Otra característica de los NMDAr es que la apertura del canal requiere la presencia de un coagonista (el aminoácido glicina) y del  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular que bloquea el canal en los voltajes hiperpolarizantes, pero no en los despolarizantes. Por ende, los NMDAr permiten el paso de cationes sólo cuando se elimina el bloqueo de  $\text{Mg}^{2+}$  mediante la despolarización de la célula postsináptica, sea por eferencias provenientes de múltiples neuronas postsinápticas o por el disparo repetitivo de la célula presináptica. Además, ciertas poliaminas como la espermina y la espermidina modulan positivamente al canal, mientras que el zinc y el exceso de protones lo modulan negativamente. Finalmente el receptor para NMDA contiene un dominio de fosforilación; la fosforilación por proteína cinasas resulta en la potenciación del NMDAr (Kutsuwada et al., 1990).

El NMDAr es una proteína muy compleja y está formado por diferentes combinaciones de varias subunidades (denominadas NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C y NMDAR2D) (Fig. 1). 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 NMDAr funcionales está constituida por cuatro variantes de la subunidad NMDAR2 (NMDAR2A-2D), codificadas por cuatro genes separados (Dávila, 2004).

Basados en los efectos de mutaciones de sitio directo se ha determinado que el sitio de unión a glicina en el receptor NMDAR1 y el sitio de unión a glutamato en el NMDAR2B están aparentemente formados por la región de la proteína en el dominio amino terminal. El sitio de unión a glicina está formado por las regiones M1 y M3 en la subunidad NMDAR1, mientras que el sitio a glutamato está formado por las respectivas regiones homólogas en la subunidad NMDAR2B. Diversos estudios han mostrado que ratones knock-out a NMDAR1 sobreviven muy pocos días después de nacer además de suprimirse la expresión de NMDAR2B, mientras que los ratones knock-out para NMDAR2A sobreviven más tiempo y se desarrollan normalmente (Sakimura et al., 1995). Adicionalmente se sabe que estos receptores juegan un papel importante en la

transmisión de información sensitiva y el mantenimiento de la conectividad sináptica entre terminales aferentes y neuronas postsinápticas en la corteza.

La expresión de las subunidades de los NMDAR1 y los NMDAR2 en diferentes regiones de cerebro de ratas y ratones no está muy bien definida, sin embargo estudios de hibridación *in situ* han revelado que de las cinco subunidades en el cerebro la NMDAR1 es la más ampliamente expresada. De la familia de los NMDAR2 se sabe que es ampliamente expresada en corteza cerebral, hipocampo y bulbo olfatorio (Ishii et al., 1993). El NMDAR2B es más prominentemente expresado en el telencéfalo y en bajos niveles en el diencefalo y en tallo cerebral; los NMDAR2C son expresados primariamente en células granulares de corteza cerebelar y los NMDAR2D sobre todo en el diencefalo y en la región del tallo cerebral (Michaelis, 1998). La caracterización de la expresión de proteínas usando anticuerpo de las subunidades NMDAR1 Y NMDAR2 ha confirmado la distribución de las datos obtenidos en los estudios basados en la hibridación *in situ* (Brose et al., 1993; Petralia et al., 1994a,b).

### **3.2.1.1 MECANISMOS DE EXCITOTOXICIDAD DEPENDIENTES DEL RECEPTOR PARA NMDA**

Previamente mencionamos que la excitotoxicidad involucra una prolongada y excesiva activación de receptores para aminoácidos excitadores seguida por una muerte neuronal. Dos diferentes fases de la muerte celular inducida por los aminoácidos excitadores han sido identificados (Mayer & Westbrook, 1987). La estimulación rápida actúa sobre receptores glutamatérgicos ionotrópicos como los AMPA y kainato, llevando a un influjo de sodio y a la despolarización de la membrana neuronal. El sustancioso flujo de sodio es acompañado de un flujo pasivo de Cl<sup>-</sup> y agua que resulta en el hinchamiento neuronal. Se ha postulado que este hinchamiento osmótico puede ser el responsable de la toxicidad aguda del glutamato ya que el reemplazo de Na<sup>+</sup> por cationes impermeables atenúa la excitotoxicidad mediada por glutamato en preparaciones aisladas (Mayer & Westbrook, 1987). Esta fase inicial de excitotoxicidad es seguida de una lenta cascada de eventos celulares que culminan en la muerte neuronal. En el caso de la excitotoxicidad mediada por NMDAr se conoce que esta fase lenta de procesos excitotóxicos es dependiente del flujo de Ca<sup>2+</sup> a través del canal que forma parte del NMDAr (Michaels & Rothman, 1990). Se ha reportado que el calcio induce la activación de fosfolipasas, proteína cinasas, endonucleasas y proteasas que eventualmente median los procesos de

excitotoxicidad (Orrenius et al., 1996). La activación de fosfolipasa A<sub>2</sub> lleva a la producción de ácido araquidónico el cual es metabolizado y en el proceso produce radicales libres (Kontos et al., 1980). La activación de la fosfolipasa C incrementa los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato que nuevamente incrementa los niveles de calcio citosólico a través de la liberación de calcio de los reservorios. El incremento intracelular de calcio puede promover la liberación de glutamato y/o la activación de proteína cinasa C (PKC) (Lynch & Bliss, 1986). Posteriormente, se ha visto que la activación de PKC dependiente de calcio en células granulares cerebelares genera un incremento en la transmisión sináptica, mientras que su inhibición ha demostrado proteger contra la toxicidad del glutamato (Favaron et al., 1990). Por otra parte, se ha demostrado que el bloqueo selectivo del NMDAr reduce el daño excitotóxico (Choi et al., 1988) y que la remoción del calcio extracelular o bien la adición de agentes quelantes de calcio intracelular aumenta la sobrevivencia neuronal (Tymianski et al., 1993b).

### **3.3 VIA DE LA KINURENINA**

La vía de la kinurenina es la mayor ruta del catabolismo del L-triptofano en mamíferos y fue reconocida como tal en 1947. La mayor función de esta vía es la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Beadle et al., 1947) (Fig. 2). Adicionalmente, esta vía metabólica ha sido descrita tanto en hígado como en cerebro de humanos, así como en primates no humanos, roedores y otros mamíferos menores (Vender, 1975; Wolfensberger et al., 1984; Moroni et al., 1984a). Se sabe que la vía de la kinurenina desempeña un importante papel en el desarrollo de funciones fisiológicas tales como la conducta y la termorregulación, entre otras (Stone, 1993; Curzon, 1996; Munn et al., 1998; Guillemin et al., 2001).

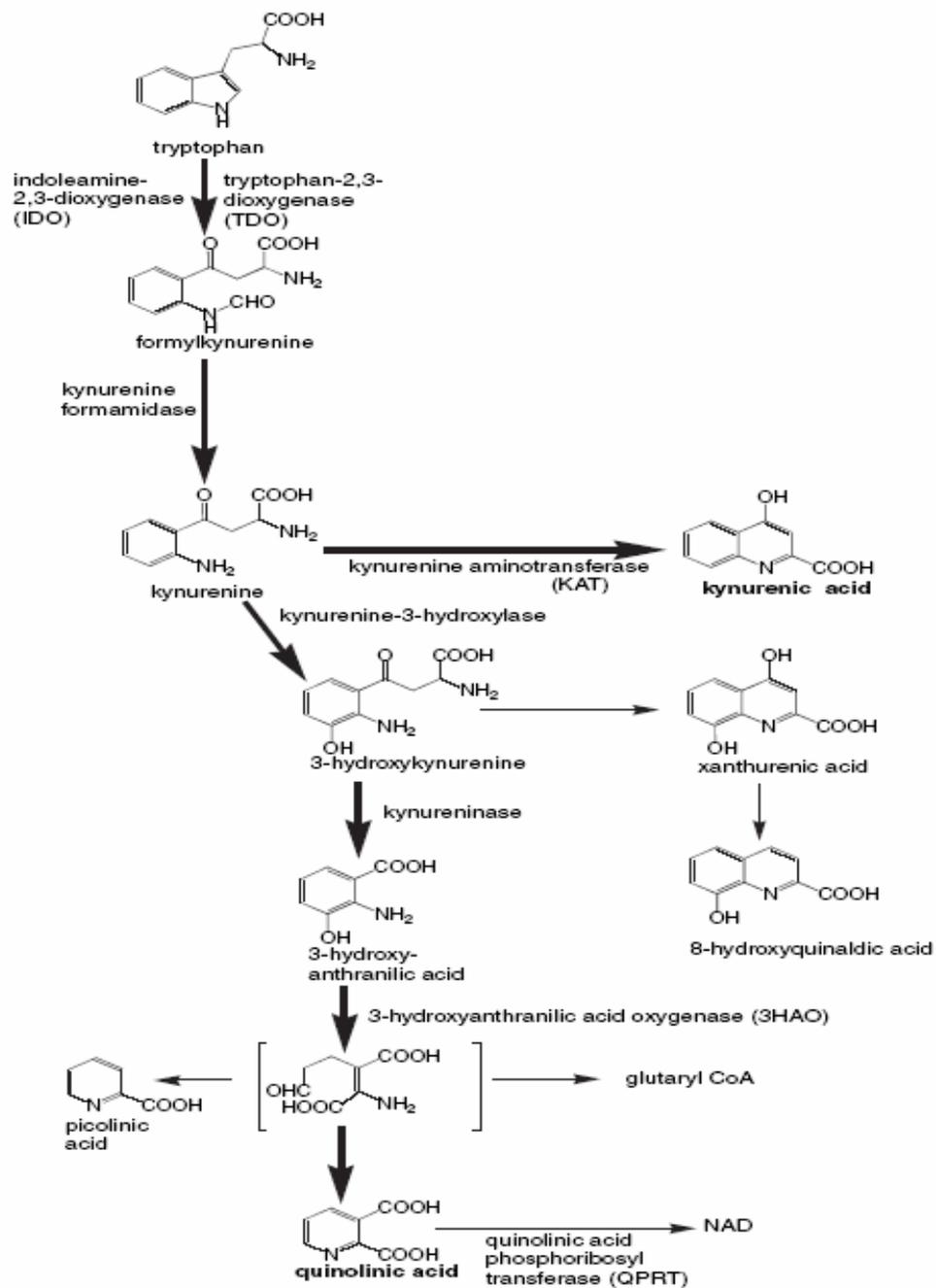
#### **3.3.1 Metabolismo de la vía de la kinurenina**

En el hígado, el anillo indólico del L-triptofano es cortado oxidativamente por la enzima triptofano dioxigenasa (TDO) produciendo N-formil kinurenina. En el cerebro y otros tejidos periféricos la enzima responsable de esta reacción es la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Esta enzima es dependiente de superóxido, por lo cual requiere de la presencia de sistemas generadores de este radical, tales como el ascorbato y la xantina-xantina oxidasa, y es inhibida por la superóxido dismutasa (Hirata & Hayaishi, 1971) y por el óxido nítrico (Thomas et al., 1994). El siguiente paso en la vía es la degradación de N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN) por la formamidasa. La L-KYN sirve como

sustrato para distintas enzimas: la kinureninasa (llevando a ácido antranílico), la kinurenina 3-hidroxilasa (lleva a 3-hidroxikinurenina (3-HK)), y las kinureninas aminotransferasas (KAT's), quienes catalizan la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA).

Es importante mencionar que la formación de ácido kinurénico (KYNA) en humanos es muy compleja e involucra dos isoformas de KAT (KAT I y KAT II). Estas enzimas difieren en su pH óptimo y se ha sugerido que la KAT II, la cual tiene un pH óptimo en el rango fisiológico puede ser la responsable de la mayor síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen et al., 1997).

Posteriormente, la vía nos lleva a la formación de QUIN a través de la hidroxilación de la kinurenina a 3-hidroxikinurenina. Esta reacción es llevada a cabo por la kinurenina hidroxilasa, una enzima localizada en la membrana mitocondrial externa (Okamoto et al., 1967) y requiere de la presencia de NADPH como donador de un electrón. La kinureninasa, una enzima pirridoxal dependiente de fosfato y que se encuentra en el citosol, convierte a la 3-hidroxikinurenina a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA). Tanto la kinureninasa como la kinurenina hidroxilasa están presentes en el sistema nervioso central, pero tienen muy baja actividad. Existe otra alternativa en la vía de la kinurenina para la formación del 3-HA, a través del ácido antranílico el cual puede ser hidroxilado por enzimas de hidroxilación microsomal no específicas y producir de esta manera el 3-HA.



**Figura 2.** Vía de la kinurenina

La ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa (3-HAO) inicia abriendo el anillo de 3-HA y convirtiéndolo en 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, un intermediario inestable, el cual es instantáneamente convertido a QUIN. En el cerebro, la 3-HAO tiene una actividad mayor que otras enzimas de la vía de la kinurenina (Okuno et al., 1987; Okuno and Kido, 1991). Inmunohistoquímicamente se ha demostrado que la 3-HAO y la KAT son

localizadas en astrocitos que están alrededor de sinapsis glutamatérgicas en el sistema nervioso central (Roberts et al., 1992; 1995). Posteriormente el QUIN es metabolizado a ácido nicotínico mononucleótido (NAD) por la enzima ácido quinolínico fosforibosil transferasa la cual está localizada en astrocitos (Stone, 1993). Interesantemente, la ácido quinolínico fosforibosil transferasa no se encuentra en astrocitos que rodean sinapsis glutamatérgicas, y estudios inmunohistoquímicos revelan que la relación de 3-HAO y ácido quinolínico fosforibosil transferasa difieren en su distribución a lo largo del cerebro, teniendo mayor presencia en la neocorteza frontal, estriado e hipocampo (Kohler et al., 1987; Kohler, 1988).

La vía de la kinurenina ha sido involucrada en diversos desórdenes, tales como la enfermedad de Huntington, en Alzheimer y en el complejo demencial del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Stone, 2001; Stone & Darlington, 2002).

### **3.3.2 METABOLITOS NEUROACTIVOS DE LA VIA DE LA KINURENINA**

En los últimos años, a varios de los metabolitos de la vía de la kinurenina se les han encontrado propiedades neuroactivas (Stone, 1993). Esto es de particular interés ya que el 95 % del triptofano proveniente de la dieta normal es metabolizado a través de esta vía y muy poco de éste es convertido a serotonina (Wolf, 1974). La primera indicación de que las kinureninas podrían jugar un papel central en el cerebro fue provista por Lapin (1978) quien notó convulsiones después de una inyección intracerebroventricular de QUIN en ratones; posteriormente se mostró que estas inyecciones de QUIN causaban lesiones excitotóxicas en el cerebro (Schwarcz et al., 1983). Tanto la excitación como la neurotoxicidad inducidas por el QUIN son mediadas por los NMDAr, lo cual sugirió que el QUIN endógeno puede participar en procesos fisiológicos y patológicos asociados con la activación del mismo receptor. Otro de los metabolitos neuroactivos de la vía de la kinurenina es la 3-hidroxicinurenina (3-HK), precursor del QUIN. A este metabolito se le han atribuido propiedades neurodegenerativas a través de la formación de radicales libres (Eastman & Guilarte, 1989), iniciando con esto una cascada de eventos intracelulares que resultan en la desintegración celular (Okuda et al., 1998). Estos eventos son responsables de la potenciación sustancial de excitotoxicidad que se observa en neuronas que son expuestas tanto al 3-HK como al QUIN (Guidetti & Schwarcz, 1999). Adicionalmente, el 3-HK y su producto de degradación, el 3-HA (inmediato bioprecursor del QUIN) generan superóxido y peróxido de hidrógeno de manera cobre-dependiente y esto promueve el

daño oxidativo a proteínas (Goldstein et al., 2000). Otro de los metabolitos neuroactivos de la vía de kinurenina es el ácido kinurénico (KYNA), el cual primero fue descrito como un compuesto inhibitorio, ya que a concentraciones altas no fisiológicas, es un agonista de amplio espectro de los receptores para aminoácidos excitadores (Perkins and Stone; 1982). En concordancia con ésto se sabe que el KYNA ejerce acciones anticonvulsivas y antiexcitotóxicas (Foster et al., 1984). A muy bajas concentraciones, KYNA también actúa como un bloqueador competitivo del sitio coagonista para glicina EN el NMDAr (Kessler et al., 1989) y como un inhibidor no competitivo del receptor  $\alpha 7$ -nicotínico de acetilcolina (Hilmas et al., 2001). El hecho de que KYNA tenga afinidad por estos dos receptores permeables a calcio en el rango en el que se encuentra en el cerebro humano y en los cerebros de roedores, sugiere una función fisiológica en la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica. Esto se ha apoyado por estudios en donde la reducción en los niveles de KYNA en el estriado aumenta la vulnerabilidad a un insulto excitotóxico (Poeggeler et al., 1998), mientras que al elevar las concentraciones de KYNA se inhibe la liberación de glutamato (Carpenedo et al., 2001).

### **3.3.3 KINURENINAS ENDÓGENAS Y DISFUNCIÓN CEREBRAL**

Las distintas propiedades convulsionantes y excitotóxicas del QUIN, las propiedades pro-excitotóxicas del 3-HK y las propiedades anticonvulsivantes y neuroprotectoras del KYNA en modelos experimentales nos llevan a considerar que las kinureninas endógenas pueden estar involucradas en enfermedades cerebrales humanas causadas por mecanismos excitotóxicos (Schwarcz et al., 1984).

La relación que hay entre las kinureninas endógenas y el fenómeno de excitotoxicidad ha sido descrita en estudios experimentales en donde se muestran los efectos neurotóxicos producidos después de una administración de QUIN en concentraciones nanomolares (Whetsell & Schwarcz, 1989; Kerr et al., 1998) y la neurotoxicidad aguda generada a consecuencia de 1  $\mu$ M de 3-HK (Okuda et al., 1998), y la eficacia anticonvulsivante de concentraciones nanomolares de KYNA (Scharfman et al., 1999). Derivado del análisis de los eventos celulares y moleculares generados por estas moléculas, es razonable pensar que una alteración en el metabolismo de la kinurenina pueda tener efectos adversos en la función cerebral, por lo que las interacciones entre estos metabolitos bien podrían ser la causa primaria de patologías en el SNC (Tabla 2). Sin embargo, no todos los cambios en el metabolismo de la vía de la kinurenina en

enfermedades humanas pueden ser correlacionados con estudios en animales. Por ejemplo, aún no es claro por que los niveles cerebrales de KYNA son reducidos en estadios finales de la enfermedad de Huntington (Beal et al., 1990) o por que específicamente los niveles corticales de KYNA (pero no los de 3-HK) son elevados en la esquizofrenia (Schwarcz et al., 2001). Estas fluctuaciones pueden ser clínicamente relevantes y ejemplificados por casos tardíos, sugiriendo así un papel crucial del KYNA en la patogénesis de ciertos desórdenes psiquiátricos. Por lo pronto, estos hallazgos indican que el destino y la función de las kinureninas pueden ser controlados por mecanismos aún desconocidos.

| Metabolito | ↑/↓        | Evento molecular   | Patología (celular/clínica)   |
|------------|------------|--|---|
| 3-HK       | ↑          | Generación de radicales libres   | Apoptosis, potenciación de excitotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurovirales, neuroinflamación, daño traumático, infarto.                               |
| QUIN       | ↑          | Activación de receptores para NMDA, generación de radicales libres                 | Excitotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, infarto cerebral, daño traumático, epilepsia, malaria cerebral, hipoxia perinatal, enfermedades neurovirales, neuroinflamación. |
| KYNA       | ↑<br><br>↓ | Boqueo del receptor para NMDA y el receptor $\alpha 7$ -nicotínico de acetilcolina | Alteraciones cognitivas, esquizofrenia.<br><br>Enfermedades neurodegenerativas, dolor, abuso de drogas.   |

**Tabla 2.** Eventos en los que están involucrados los metabolitos neuroactivos de la vía de la kinurenina.

De relevancia es el hecho de que un incremento en los niveles de 3-HK ha sido descrito en putamen, corteza frontal y temporal de pacientes con la enfermedad de Huntington, pero no en cerebros de pacientes con Alzheimer (Pearson & Reynolds, 1992; Guidetti et al., 2000). Esta molécula produce daño neuronal, generando especies

reactivas de oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de inducir apoptosis como resultado del estrés oxidativo (Eastman & Guiliarte 1989; 1990; Nakagami et al., 1996; Okuda et al., 1996; 1998). Estos hallazgos son consistentes con la demostración de que en cerebros de pacientes con la enfermedad de Huntington se incrementa la actividad de la 3-hydroxyantranilato oxigenasa, una de las enzimas responsables de su remoción (Schwarcz et al., 1988).

Los niveles de 3-HK también se encuentran elevados en el caso de infecciones virales en el síndrome de inmunodeficiencia humana, especialmente el asociado con demencia (Person & Reynolds, 1991; Sardar et al., 1995), espasmos infantiles (Yamamoto et al., 1994) y encefalopatía hepática (Person & Reynolds, 1991).

### 3.4 ACIDO QUINOLÍNICO (QUIN)

El QUIN (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico) (Fig. 3), es un metabolito endógeno del L-triptofano que se forma en la vía de la kinurenina (Vender, 1975), además de ser un conocido agonista con actividad sobre NMDAr.

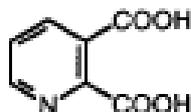


Figura 3. Estructura del QUIN

#### 3.4.1 DAÑO EXCITÓTOXICO

Hasta 1981, se creía que el QUIN era un metabolito fisiológico inactivo del triptofano; su potencial fisiológico y farmacológico fue reconocido con el descubrimiento de que el QUIN era capaz de activar selectivamente la subpoblación de receptores glutamatérgicos sensibles a NMDA (Stone & Perkins, 1981). El flujo masivo de glutamato ocurre en neuronas y glia seguido de hipoxia e isquemia, llegando a concentraciones neurotóxicas y reforzando la hipótesis de excitotoxicidad, en la cual la sobrestimulación de receptores glutamatérgicos contribuyen al daño neuronal (Olney, 1969). La población de NMDAr atrajo su máxima atención cuando se descubrió que su activación está asociada con un sustancial incremento en el flujo de calcio en neuronas blancas. El calcio está íntimamente involucrado con la excitotoxicidad dado que la entrada de estos iones lleva a una serie de eventos de daño neuronal. El QUIN, un compuesto endógeno capaz de activar selectivamente a los NMDAr, es de gran interés debido a su posible involucramiento en diferentes estados patológicos. Se sabe que este interactúa

específicamente con los subtipos NR2A y NR2B de los NMDAr (de Carvalho et al., 1996), los cuales se encuentran distribuidos en hipocampo, estriado y la capa externa de la corteza cerebral (Nakanishi, 1992). Además el QUIN está involucrado en diferentes procesos fisiológicos y patológicos también durante el desarrollo cerebral (Hunt et al., 1990). Se sabe que a bajas concentraciones el QUIN puede proteger a las neuronas contra la toxicidad del glutamato (Sei et al., 1998). Sin embargo, exposiciones prolongadas de estructuras corticoestriatales a concentraciones submicromolares de QUIN conducen invariablemente a la muerte neuronal (Whetsell et al., 1989).

En cerebros post-mortem de pacientes con la enfermedad de Huntington, Young y colaboradores (1988) detectaron una pérdida de NMDAr consistente con un incremento en la pérdida de células relacionadas con estos receptores en respuesta a procesos excitotóxicos mediados por glutamato o por QUIN. Recientemente, Jacquard y colaboradores (2006) mostraron que la excitotoxicidad mediada por NMDAr es potenciada por defectos mitocondriales que involucran primariamente la desregulación de  $Ca^{2+}$  en ausencia de hipersensibilidad a dichos receptores. Por su parte, la actividad pro-oxidante del QUIN *in vitro* está relacionada parcialmente con su capacidad de estimular a los NMDAr.

### **3.4.2 DAÑO OXIDATIVO**

Las acciones tóxicas del QUIN están primordialmente vinculadas a la sobreactivación de NMDAr a través de procesos típicos de excitotoxicidad (Stone, 1993; Susel et al., 1989). Más recientemente, se ha reportado evidencia que involucra al estrés oxidativo como una parte integral del modelo de toxicidad inducido por QUIN (Rodríguez-Martínez et al., 2000; Behan et al., 1999). En este punto, es importante mencionar que una pequeña fracción de este daño corresponde a componentes independientes de la activación de receptores para NMDA (Santamaría et al., 2001; Behan et al., 1999; Stone et al., 2000). En apoyo directo a esta hipótesis, se ha demostrado la capacidad del QUIN de modificar los perfiles de algunos antioxidantes endógenos en el cerebro de ratas - tales como el contenido de glutatión reducido, el glutatión oxidado y la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) - (Rodríguez-Martínez et al., 2000), así como su habilidad para generar radical  $\cdot OH$  durante estadíos tempranos de toxicidad (Santamaría et al., 2001). La formación de  $\cdot OH$  inducida por QUIN resulta mayoritariamente, pero no completamente, sensible al MK-801, un potente antagonista de NMDAr, sugiriendo de esta manera que una pequeña fracción del daño oxidativo es

independiente de la activación del NMDAr. La evidencia de un papel activo del estrés oxidativo y nitrosativo en el modelo de toxicidad evocado por el QUIN está basado en la habilidad de la toxina de formar complejos QUIN-Fe(II), los cuales regulan la formación de  $\cdot\text{OH}$ , mismo que es responsable del daño a DNA *in vitro* y la peroxidación de lípidos (Goda et al., 1996). Adicionalmente, el QUIN y otros compuestos relacionados han mostrado su capacidad de aumentar la reacción de Fenton en soluciones amortiguadoras de fosfatos, lo cual ha conducido a la subsecuente formación de  $\cdot\text{OH}$  (Iwahashi et al., 1999). En apoyo a estos datos, se ha reportado que el QUIN y otros compuestos con anillo piridínico son capaces de inhibir la auto-oxidación de iones hierro (Murakami et al., 1998). Además, otros dos hallazgos refuerzan estas consideraciones: 1) se sabe que la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN *in vitro* en tejido nervioso es dependiente de la formación de los complejos QUIN-Fe(II) (Stipek et al., 1997), y 2) parece ser que el hierro ferroso puede estar modulando negativamente la potenciación de la unión del [ $^3\text{H}$ ]MK-801 al NMDAr en presencia de QUIN en membranas sinápticas de cerebro de rata (Stastny et al., 1999). Estas evidencias sugieren una capacidad intrínseca del QUIN de actuar como un quelante de metales, soportando de esta manera su naturaleza pro-oxidante.

Otros estudios han descrito la potencia oxidativa del QUIN por el incremento en la peroxidación lipídica y el daño oxidativo en diferentes preparaciones de tejido nervioso tanto *in vivo* como *in vitro* (Santamaría & Ríos, 1993; Stastny et al., 1991; Santamaría 2001), enfatizando la relevancia de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERO/ERN) durante la generación de episodios excitotóxicos. Sobre este punto, otros hallazgos importantes son los reportados por Schwartz y colaboradores (1998), quienes evaluaron los efectos de la expresión de la Cu,Zn-SOD en la toxicidad inducida por QUIN en ratones transgénicos en la sobre y baja regulación, donde la primera condición resultó en neuroprotección del estriado, y la segunda produjo un intenso daño estriatal. A su vez, estos hallazgos son reforzados por una correlación entre los eventos excitotóxicos y los procesos oxidativos. En particular, las ERN, tales como el ON y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), han sido involucradas en la neurotoxicidad y el daño oxidativo inducido por el QUIN (Nakamura et al., 1995; Santamaría et al., 1997; Noak et al., 1998; Ryu et al., 2004; Santiago-López et al., 2004).

Diferentes atrapadores de ERO e inductores de la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la melatonina (Lapin et al., 1998; Southgate et al., 1998) y el deprenil (Behan et al., 1999), protegen al tejido nervioso del daño oxidativo y la

neurotoxicidad inducidos por el QUIN, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Otros importantes agentes antioxidantes han sido probados con éxito contra la toxicidad del QUIN, incluyendo la alfa-fenil-t-butil nitrona (Nakao et al., 1996), poliaminas como la espermina y la espermidina (Belle et al., 2004), el quelante de hierro deferoxamina (Stipek et al., 1997), el glutatión reducido (Santamaría et al., 2001), y algunos seleno-compuestos que mimetizan la actividad de la GPx como el ebselen (Rossato et al., 2002; Rossato et al., 2002b). Interesantemente, el atrapador sintético de radicales libres, el OPC-14117, ha mostrado reducir la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) – un factor de transcripción comunmente relacionado con cascadas de muerte celular apoptótica - en el estriado de la rata (Nakai et al., 1999). Estos hallazgos son particularmente relevantes dado que algunos de estos compuestos son agentes antioxidantes bien descritos como el selenio, los cuales pueden inhibir vías de transcripción pro-apoptóticas, incluyendo el factor nuclear de translocación del NFκB y su consecuente activación (Makropoulos et al., 1996) al controlar la vida media de su proteína de unión citoplasmática, la I kappa B alpha (IκB-α) (Kretz-Remy & Arrigo, 2001). A este respecto, Santamaría y colaboradores (2005) recientemente demostraron que el selenio tiene acciones protectoras sobre la neurotoxicidad inducida por QUIN, y esta protección está relacionada con la estimulación estriatal de la actividad de la GPx, la preservación de IκB-α, la reducción en la expresión de NFκB y la inhibición de la actividad de la caspasa-3, resultando en una preservación de DNA internucleosomal. Todas estas evidencias sugieren que el selenio, al estar estimulando la actividad de la GPx, puede ser responsable de la remoción de ERO, y de esta manera prevenir las señales apoptogénicas.

Por otra parte, en preparaciones de cerebro de rata, el QUIN (100 μM) puede aumentar la peroxidación de lípidos hasta en un 256 % (Rios & Santamaría, 1991). Estos resultados fueron reproducidos por otros grupos, con la demostración adicional que el daño inducido por QUIN puede ser prevenido por antioxidantes como la melatonina y el deprenil (Southgate et al., 1998; Behan et al., 1999). La peroxidación de lípidos inducida por QUIN también puede ser prevenida por nitro-arginina y potenciada por L-arginina, sugiriendo que el NO - un radical libre y precursor de potentes especies reactivas como el ONOO<sup>-</sup> - puede contribuir en el daño evocado por QUIN (Santamaría et al. 1997). Ahora se sabe que la inhibición de la sintasa del óxido nítrico (SON) es un evento que puede prevenir la neurotoxicidad evocada por el QUIN (Pérez-Severiano et al., 1998; Kalosch et al., 1999). Teniendo evidencias de la activa participación del ON, y sabiendo que existen las condiciones necesarias para la formación de ONOO<sup>-</sup> en el modelo de toxicidad

evocado por el QUIN, recientemente se exploraron estrategias experimentales que consisten en probar los efectos de agentes capaces de catalizar la descomposición de ONOO<sup>-</sup>. Algunos de estos agentes son las porfirinas de hierro, tales como el tetrakis(pentafluorofenil porfirinato de hierro), el cual muestra la reducción de 3-nitrotirosina (biomarcador de la presencia de ONOO<sup>-</sup>), así como una disminución en la neurotoxicidad y el daño oxidativo asociados con la toxicidad inducida por el QUIN (Santiago-López et al., 2004). Este reporte en particular constituye un antecedente directo para la realización del presente trabajo de tesis.

### **3.4.3 ALTERACIONES ENERGÉTICAS**

Desde los 80's ya se sabía que la inyección de QUIN en el hipocampo de las ratas causaba disminución en los niveles de ATP (Vezzani et al., 1987), pero fue hasta los 90's que Bordelon y colaboradores (1997) evaluaron las alteraciones energéticas como parte de la cascada de daño excitotóxico evocado por QUIN, a través de la actividad de la cadena respiratoria como la vía responsable de la disminución de ATP. Sus resultados mostraron una reducción en el consumo de oxígeno desde las 6 horas después de la inyección de QUIN. Por ello, tanto la alteración en la función mitocondrial observada después de la administración de dicha toxina, como la disminución en los niveles de ATP y NAD, se sugirieron como eventos secundarios a la carga excesiva de calcio en organelos celulares, apoyando así la hipótesis de que la disfunción mitocondrial puede ser un evento crítico en la cascada de muerte celular en modelos excitotóxicos de las enfermedades neurodegenerativas. Con estas evidencias se sugiere que los efectos tempranos de QUIN en la actividad estriatal y en el flujo de iones pueden contribuir a las subsecuentes anormalidades en el metabolismo energético, las cuales a su vez constituyen un factor para la neurodegeneración y la eventual muerte celular excitotóxica.

Se ha reportado recientemente que un aumento en el metabolismo celular podría constituirse como un factor neuroprotector (Maus et al., 1999; Sheline et al., 2000). En el caso particular del piruvato, el cual puede ser utilizado por las células como un sustrato energético, éste precursor metabólico produce efectos protectores contra el daño tóxico evocado por el QUIN, sugiriendo que el piruvato puede ser efectivo reduciendo el daño neuronal en la enfermedad de Huntington (Ryu et al., 2003). Adicionalmente, hay evidencia de que las lesiones producidas por el QUIN pueden ser consecuencia del daño oxidativo, y que el piruvato, pero no el lactato, exhibe un espectro de actividad que bloquea este daño. Estos resultados son acompañados por evidencia que sugiere que la

microglia y los astrocitos contribuyen activamente a la neurodegeneración, aumentando la producción de ERO en respuesta al QUIN. Por otra parte, Maksimovic y colaboradores (2001) determinaron que la actividad de la citocromo C oxidasa, un componente de la cadena respiratoria, es incrementada en estriado e hipocampo de animales tratados con QUIN (150 nM), reforzando así la idea de que el QUIN produce disfunción en el metabolismo energético.

Un muy reciente estudio muestra el efecto del QUIN *in vitro* sobre el metabolismo energético en cerebro de ratas jóvenes, encontrándose que la toxina aumenta la recaptura de glucosa en un 55 %, mientras que la actividad del complejo II de la cadena de transporte mitocondrial es inhibida en un 35 % (Schuck et al, en prensa). La inhibición del complejo II fue prevenida por la pre-incubación de los homogenados corticales con superóxido dismutasa más catalasa, indicando que este efecto es probablemente mediado por ERO. Estos datos proveen evidencia de que el QUIN provoca una alteración en el metabolismo energético cerebral *in vitro*.

### **3.4.3 ALTERACIONES CONDUCTUALES**

En cuanto a la parte conductual, Sanberg y colaboradores (1989) estudiaron las anomalías locomotoras en animales administrados con diferentes dosis de QUIN y observaron que la inyección bilateral de la toxina (75 nmoles) no tenía efectos significativos en la locomoción; en contraste, 150 y 225 nmoles de la toxina indujeron hiperactividad y pérdida de peso, mientras que 300 nmoles son letales para el animal. Teniendo en cuenta los estudios previos de Schwarcz y colaboradores (1983) donde se demostró que después de la lesión estriatal con QUIN (150 nmol) hay una marcada disminución en la actividad de la colina acetiltransferasa y en la glutamato descarboxilasa, y que la inmunoreactividad a GABA sólo es disminuida después de las 75 nmoles de QUIN (Beal et al., 1986), se estableció la compleja relación entre la dosis de QUIN, el tiempo post-lesión y la respuesta conductual.

Recientemente Shear y colaboradores (1998) compararon los efectos de las inyecciones intraestriales de QUIN y del ácido 3-nitropropiónico (toxina mitocondrial) en ratas. Los resultados mostraron que ambas toxinas causan un incremento en los niveles de la actividad a las dos semanas de la lesión, pero sólo el QUIN es capaz de mostrar hiperactividad a las cuatro semanas post-lesión. Las ratas tratadas con 3-NP, pero no con QUIN, mostraron rigidez progresiva, aunque ambas toxinas son capaces de afectar el aprendizaje. Por otra parte, un estudio en primates no humanos reveló que los animales

tratados con QUIN muestran hiperactividad nocturna, así como una postura anormal, además de que en la prueba de recuperación de objetos, éstos animales mostraron deterioro en las respuestas de éxito (Rioitberg et al., 2002). La infusión crónica de QUIN en el estriado de rata induce déficit de aprendizaje espacial en el laberinto acuático radial, llevando a los autores a proponer que el aumento crónico de QUIN puede inducir déficit conductual y motor similar al observado en la enfermedad de Huntington (Susel et al., 1991; Shear et al., 1998). Todos estos datos sugieren que el QUIN mimetiza los estadios tempranos de alteraciones motoras de la enfermedad de Huntington, mientras que la inyección intraestriatal de 3-NP mimetiza los estadios tempranos y tardíos de dicha enfermedad.

### **3.4.5 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS**

La infusión de QUIN en el estriado de las ratas resulta en lesiones de “axón preservado”, con un marcado hinchamiento de dendritas, vacuolización y pérdida de la estructura celular en sitios post-sinápticos, pero con preservación de axones y terminales pre-sinápticas (Schwarcz et al., 1983; McGreer and Singh, 1984). Adicionalmente, Portera-Cailliau y colaboradores (1997) estudiaron la morfología ultraestructural que conlleva a la activación de NMDAr y receptores no-NMDA, a través de las inyecciones intraestriatales de QUIN y ácido kaínico (AK), respectivamente. Estos autores encontraron que la neurotoxicidad aguda del QUIN es bloqueada por el pretratamiento con MK-801, mientras que la neurotoxicidad del ácido kaínico no es alterada por este pretratamiento. También encontraron que las neuronas dañadas con el ácido kaínico tienden a encogerse y a formar círculos de cromatina que son característicos de la morfología apoptótica; en contraste, las neuronas dañadas con QUIN se hinchan y se lisan, lo cual es característico de los procesos necróticos. Más aún, el QUIN inyectado a una dosis de 60 nmoles, mostró dos tipos distintos de morfologías neuronales a las 6 horas posteriores a la lesión: algunas neuronas tienen cuerpos celulares oscuros y de forma delgada con numerosas vacualizaciones citoplasmáticas, mientras que otras se ven hinchadas, con pocas pero largas vacuolas citoplasmáticas y un núcleo rodeado con grupos extensivos de cromatina. A las 12 horas de la inyección el QUIN la lesión progresa a una fase de desintegración de la membrana y completa disolución de la matriz citoplasmática. Las neuronas medianas del estriado que son afectadas por el QUIN revelan la secuencia temporal de cambios

citoplasmáticos, nucleares y neurofibrilares. En dicho estudio también se observó que el QUIN muestra acumulación de vacuolas desde los primeros 15 minutos post-inyección, y que estas llegan a la cumbre a las 6 hrs. En tiempos cortos, el retículo endoplásmico rugoso fue dispersado y la mitocondria mostró evidencia de hinchamiento, vacuolización y lisis. En las neuronas espinosas medianas la desintegración de las membranas plasmáticas y nucleares resultó en la dispersión de los contenidos neuronales. Las vacuolas largas de neuronas circundantes se manifestaron de 2 a 6 horas post-lesión, así como también el correspondiente hinchamiento de astrocitos. Con la destrucción de las membranas plasmáticas neuronales y astrogliales, se fusionaron las vacuolas y formaron largos espacios alrededor de los remanentes nucleares, llevando a la conclusión de que el QUIN genera muerte de neuronas en un patrón no apoptótico de condensación de cromatina y destrucción temprana de organelos citoplasmáticos.

#### **3.4.6 QUIN E INFLAMACIÓN**

La mayoría de las formas de daño tisular es acompañada por una reacción inflamatoria, con la activación de monocitos, macrófagos periféricos y células microgliales, y la invasión de macrófagos activados en el SNC. Es claro que la estimulación de estas células (por lipopolisacárido o por interferón- $\gamma$ ) puede inducir componentes de la vía de la kinurenina, con la activación de macrófagos y células gliales produciendo QUIN y otras citotoxinas (Heyes et al., 1992e; Espey et al., 1997). La microglia humana, macrófagos y cultivos de células cerebrales fetales humanas pueden ordinariamente convertir triptofano, kinurenina o 3-HK en QUIN, aún cuando no sean estimulados (Heyes et al., 1992). El tratamiento con interferón- $\gamma$  incrementa las actividades de la indolamina-2,3-dioxigenasa, de la kinurenina 3-hidroxilasa, la kinureninasa y la ácido 3-hidroxiantranílico oxigenasa, generando así un aumento en la producción de QUIN y logrando niveles de 438 a 1410 nM en glia y macrófagos, respectivamente (Heyes et al., 1996). El aumento de QUIN en el cerebro después de la estimulación inmune puede ser prevenido con inhibidores del metabolismo, o por agentes anti-inflamatorios esteroideos como la dexametasona, un compuesto capaz de suprimir la activación de células inmuno-competentes (Saito et al., 1994).

La vía de la kinurenina es activada por radicales libres, interferones y citocinas producidas durante la respuesta inflamatoria, llevando a la inducción de laIDO yTDO, enzimas responsables de convertir al triptofano en kinurenina. Como ya vimos antes, el

QUIN, un producto de esta vía, actúa como agonista del NMDAR (Stone, 2001; Stone et al., 1981; Schwarcz et al., 1983) y causa daño neuronal, mientras que el KYNA actúa como antagonista de estos receptores (Perkins & Stone, 1982). Otros productos de la vía, tales como la 3-HK y el ácido 3-hidroxiantranílico, pueden generar ERO e inducir daño neuronal (Eastman & Guilarte, 1989; 1990; Okuda et al., 1996; 1998), al igual que lo hace el QUIN (Rios & Santamaría, 1991; Behan et al., 1999).

El incremento en los niveles de QUIN ocurre en desórdenes inflamatorios y neurológicos severos. Sinz y colaboradores (1998) demostraron un aumento en las concentraciones de esta toxina en el líquido cefalorraquídeo seguido de pacientes con daño traumático cerebral. En estudios en animales, Blight y colaboradores (1995) demostraron la contribución del QUIN al déficit neurológico secundario por efecto del daño por compresión del cordón espinal de coballos.

A través de estudios inmunohistoquímicos, se ha revelado la ausencia completa de inmunoreactividad a QUIN en cerebros humanos normales (Mofett et al., 1993), mientras que bajo condiciones patológicas severas la microglia activada (y macrófagos cerebrales) parecen mostrar una capacidad significativa para sintetizar y acumular QUIN en vacuolas y liberarlo por un sistema de transporte sensible a probenecid (Baratté et al., 1998; Heyes et al., 1996; Morrison et al., 1999). La estimulación con citocinas, preferencialmente con interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), incrementa sustancialmente la actividad de laIDO en macrófagos activados (Chiarugi et al., 2000), así como también la actividad de otras enzimas relacionadas con la síntesis de QUIN, tales como la kinureninasa y la kinurenina 3-hidroxilasa. Adicionalmente, se sabe que la kinurenina 3-hidroxilasa, y su estimulación por INF- $\gamma$ , es crucial para la síntesis de QUIN en la microglia y macrófagos (Heyes et al., 1996). El QUIN ha mostrado inducir la expresión de quimiocinas y receptores de quimocina en astrocitos, conduciendo así a una posible amplificación de la inflamación cerebral (Guillemin et al., 2003). El daño neuronal y sináptico iniciado por la activación de la microglia y mediado por el QUIN conduce eventualmente a la muerte apoptótica de oligodendrocitos y microglia, junto con la pérdida de positividad a GFAP de astrocitos (Camer, 2001; Dilné et al., 2001)

### **3.4.7 APOPTOSIS VS. NECROSIS**

La asociación entre las células cerebrales apoptóticas y el incremento de los niveles de QUIN han sido encontrados en diferentes desórdenes neurodegenerativos.

Guillemin y colaboradores (2005) demostraron que el tratamiento con QUIN a concentraciones tóxicas, induce cambios morfológicos y bioquímicos propios de la apoptosis en un subgrupo de astrocitos humanos de manera dosis dependiente. En pacientes con el complejo SIDA-demencia, los altos niveles de QUIN son asociados con la alta relación de apoptosis de astrocitos adultos (Thompson et al., 2001); sin embargo, los receptores y las vías de señalización que inician la apoptosis astrogial aún no han sido identificados. No obstante, dos grandes mecanismos pueden estar potencialmente involucrados. El primero es la activación de los NMDAr por QUIN, el cual se conoce ampliamente que puede mediar la apoptosis neuronal por la activación de caspasa-3 (Yu et al., 1999; Tenneti & Lipton, 2000; Kerr et al., 1995; Stone, 2001); sin embargo, la presencia de los NMDAr en astrocitos es aún controversial (Schipke et al., 2001; Conti et al., 1997), por lo cual la posibilidad de que una vía similar esté involucrada en neuronas y astrositos es aún especulativa. La segunda posibilidad representa un importante aspecto de la toxicidad del QUIN, la peroxidación de lípidos (Rios & Santamaría, 1991), ya que el QUIN a concentraciones bajas (120 nM) induce peroxidación y formación de radicales libres, llevando a la muerte neuronal (Behan et al., 1999). Este segundo mecanismo es el más fuertemente involucrado en la apoptosis de astrocitos inducida por QUIN. En apoyo a lo anterior, se sabe que después de la inyección de QUIN en el cerebro de rata hay una reducción en la densidad de la inmunoreactividad de GFAP de astrocitos, ocurriendo tempranamente (6 horas después de la lesión) y sugiriendo muerte astrocítica, la cual puede estar asociada con necrosis y apoptosis (Bjorklund et al., 1986; Dihne et al., 2001). Además, el QUIN incrementa la liberación neuronal de glutamato e inhibe su recaptura por astrocitos, llevando así a una excesiva concentración de glutamato en el microambiente neuronal, y secundariamente a la neurotoxicidad (Tavares et al., 2002).

Por otra parte, se ha reportado que los agonistas de receptores glutamatérgicos activan al NF- $\kappa$ B vía la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  (Nakai et al., 1999; Qin et al., 1999). Diversos estudios han sugerido que el QUIN activa a la caspasa-3, lo cual lleva a la translocación nuclear del factor NF $\kappa$ B por la aceleración de la degradación de su proteína de unión citoplasmática, la I $\kappa$ B- $\alpha$  (Qin et al., 1999). Nakai y colaboradores (2000) demostraron que la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  inducida por la estimulación del NMDAr a través del QUIN es totalmente mediada por un mecanismo dependiente de caspasa-3 (Qin et al., 2000), además de que el empleo del OPC-14117, un atrapador de radicales libres, atenúa este efecto de degradación inducido por el QUIN, sugiriendo que el estrés oxidativo es el factor más importante para la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ . A este respecto, se ha demostrado que la

activación de NF $\kappa$ B sobre-regula la p53, indicando que NF $\kappa$ B contribuye a la apoptosis inducida por excitotoxinas vía la inducción de reguladores del ciclo celular (Qin et al., 1999; Aleyasin et al., 2004; Grilli et al., 1999). La proteína p53 juega un papel crítico en la muerte celular y la sobrevivencia, ya que hay recientes estudios que muestran que los niveles de p53 pueden ser regulados por NF $\kappa$ B (Qin et al., 1999; Aleyasin et al., 2004; Wu et al., 1994). Cao y colaboradores (2005) mostraron que Ac-YVAD-CHO, un inhibidor sintético de la caspasa-1, no tiene efectos en la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  ni en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por QUIN; en contraste, este inhibidor atenúa el incremento en los niveles de la proteína p53 y en la fragmentación de ADN internucleosomal, sugiriendo así que la caspasa-1 determina la inducción de p53 y puede contribuir a la apoptosis inducida por el QUIN.

En contraste, otros autores han sugerido que la muerte celular excitotóxica seguida de la inyección intracerebral de QUIN no es mediada por apoptosis, debido a que no se ha encontrado fragmentación de ADN internucleosomal (Ignatowicz et al., 1991). Contrario a esto, Portera-Cailliau y colaboradores (1995) demostraron que el patrón de escalera del ADN ocurre in vivo en las primeras horas de haber inyectado la toxina, y que tiempo después éste se pierde, convirtiéndose en una mancha, lo que sugiere componentes necróticos de muerte celular. A nivel ultraestructural, las neuronas lesionadas por QUIN muestran morfología necrótica, y a diferentes tiempos post-lesión no se encuentran indicios de apoptosis, por lo que la posible explicación a esto es que la fragmentación del ADN internucleosomal es un paso común temprano en todos los tipos de muerte celular, y dependiendo de que proteasas sean liberadas, resultará en muerte apoptótica o necrótica.

En otro reporte reciente se evaluaron los procesos de muerte activados por la 3-HK y el QUIN (Chiarugi et al., 2001), encontrándose que la potencia neurotóxica de la 3-HK o el QUIN fueron cuantitativamente similares, aunque las vías de muerte activadas por estas toxinas fueron considerablemente diferentes. La 3-HK activa primordialmente procesos apoptóticos de muerte neuronal, mientras que las neuronas expuestas a QUIN principalmente mueren por necrosis. En este mismo contexto, los antagonistas del receptor para NMDA, inhibidores de la SON neuronal (SONn) y los inhibidores de PARP previenen la toxicidad inducida por QUIN, pero no la de 3-HK. Estas observaciones sugieren que la vía de muerte responsable de la toxicidad de QUIN involucra la activación de SONn mediada por NMDAr y la activación de PARP, lo cual resulta en un colapso energético y

finalmente en la muerte celular de tipo necrótico, primordialmente (Zhang et al., 1994; Ha & Zinder 1999; Pieper et al., 1999).

En general podemos decir que es posible que mecanismos de muerte necrótica y apoptótica puedan coexistir simultáneamente dentro de células que se están degenerando por acción del QUIN, pero es importante mencionar que ultraestructuralmente la morfología apoptótica es ocultada por la rápida lisis necrótica de las células.

### **3.4.8 IMPLICACIONES EN ENFERMEDADES**

#### **3.4.8.1 Enfermedad de Huntington**

Entre las características neuropatológicas de la enfermedad de Huntington (EH) está la sobrevivencia de interneuronas colinérgicas medianas y largas en el neocórtex, lo cual ha podido ser reproducido en animales por la inyección intraestriatal de QUIN, sugiriendo que esta toxina puede estar involucrada en la patogénesis de esta enfermedad (Schwarcz & Albin, 2002). Estudios posteriores indican que otros dos productos metabólicos de la vía de la kinurena pueden estar jugando un papel importante en la fisiopatología de la EH. La 3-HK induce muerte neuronal en cultivos de neuronas estriatales (Okuda et al., 1996) y potencia la excitotoxicidad del QUIN *in vivo* e *in vitro* (Chiarugi et al., 2001; Guidetti & Schwarcz, 1999). En contraste, el KYNA provee neuroprotección anti-excitotóxica y es particularmente efectivo previniendo el daño inducido por QUIN (Foster et al., 1984; Schwarcz & Pellicciari, 2002). Recientemente, Guidetti y colaboradores (2004) mostraron que los niveles de QUIN y 3-HK son incrementados tres o cuatro veces en la neocórtex y el neocórtex de pacientes con la EH en grado 1, aunque los niveles de estos dos metabolitos no mostraron ningún cambio o tendencia a disminuir en grados más avanzados de la enfermedad. En conjunto, estos resultados revitalizan la hipótesis de la participación del QUIN en la HD propuesta desde hace más de 20 años (Schwarcz et al., 1983) y sugieren específicamente que la 3-HK y el QUIN pueden participar en fases iniciales de procesos neurodegenerativos en la EH. Particularmente, se propone que el incremento en estos metabolitos acelera la muerte neuronal a través de la activación de receptores para NMDA y la generación de radicales libres.

#### **3.4.8.2. Decline cognitivo**

La infusión subcrónica (2 semanas) en los ventrículos cerebrales de ratas con QUIN produce déficit de la memoria acompañado de la pérdida selectiva de neuronas

(Misztal et al., 1996). Esta situación se cree que está asociada con la edad, desde que los niveles de diferentes kinureninas (incluyendo al QUIN) son incrementados conforme avanza la edad (Moroni et al., 1984; Gramsbergen et al., 1992; Wada et al., 1994), pudiendo ser que el QUIN esté mediando dichos cambios. La importancia del KYNA radica en que, como ya hemos descrito, este metabolito de la vía de la kinurenina se une al sitio de glicina 2 del NMDAr, y estudios previos han mostrado que una acumulación de los niveles de KYNA contribuyen al decline cognitivo, así como el hecho de que su receptor puede ser un blanco apropiado para el desarrollo de nuevos fármacos capaces de mejorar la cognición por la reducción en el bloqueo del receptor (Pittaluga et al., 1995; Pittaluga et al., 1997). En este mismo contexto, un incremento en la concentración de KYNA subyacería al decline cognitivo en el tiempo, y ésto es apoyado por hallazgos en los que se describe un incremento en los niveles de la kinurenina y del KYNA con la edad de las ratas (Moroni et al., 1988; Gramsbergen et al., 1992; Wada et al., 1994). Ohno y colaboradores (1994) han mostrado que el bloqueo del sitio 2 de glicina del NMDAr a través de KYNA o de ácido 7-clorokinurénico, interfiere con las tareas de memoria (Steele & Stewart, 1993).

#### **4.4.8.3 Isquemia cerebral**

Es sabido que el daño neuronal que ocurre después de un período de isquemia cerebral en un modelo animal moderado (5-15 min) no presenta cambios en los niveles de QUIN durante las primeras 24 horas, pero sí se observa un aumento tardío en los niveles de esta toxina de 50 veces su valor basal después de varios días posteriores al evento isquémico (Heyes & Nowak, 1990; Saito et al., 1993). Estos cambios son acompañados por un incremento en la actividad de todas las enzimas metabólicas de la kinurenina, excepto de la kinurenina aminotransferasa, responsable de la formación del KYNA. El resultado de la inducción de la isquemia es el cambio en la relación de los niveles QUIN y KYNA, lo cual puede estar contribuyendo al daño cerebral, y ésto es apoyado por el hecho de que el KYNA, o bien análogos de éste, son capaces de disminuir el daño isquémico en diversos modelos (Wood et al., 1993). Lees (1993) ha propuesto que la microglia y los macrófagos pueden contribuir a la muerte neuronal tardía que se ha observado después de la isquemia cerebral, probablemente por la secreción de QUIN. Más aún, hay evidencia directa obtenida por Baratte y colaboradores (1998), en la que el QUIN resulta inmunohistoquímicamente positivo en la microglia en el cerebro de gerbos a 4 y 7 días después de un evento isquémico.

#### **4.4.8.4 Daño traumático**

Después del daño traumático cerebral humano hay un incremento de 50 veces los niveles de QUIN en líquido cefalorraquídeo (Sinz et al., 1998). Los niveles de QUIN correlacionan con la mortalidad resultado del insulto cerebral. Un incremento de QUIN en líquido cefalorraquídeo ha sido recientemente detectado también en niños que sufrieron un daño traumático severo (Bell et al., 1999). En dicho reporte, los niveles de QUIN fueron correlacionados con el índice de mortalidad, apoyando la hipótesis de que los procesos inflamatorios involucran la generación de QUN, mismo que puede contribuir a los efectos del trauma y a la mortalidad.

#### **4.4.8.5 Epilepsia**

En la epilepsia se ha encontrado que hay una pérdida en los niveles de la ácido quinolínico fosforibosiltransferasa en tejido de pacientes epilépticos en comparación con los individuos no epilépticos (Feldblum et al., 1998), aumentando así la posibilidad de que la ausencia de esta enzima resulte en un incremento en los niveles de QUIN en algunas células o compartimientos celulares en el foco epiléptico, los cuales pueden no ser detectables durante un análisis general de contenido en el tejido. En adición a lo anterior, la concentración de KYNA es más baja de lo normal en pacientes con espasmos infantiles, con la posibilidad de que el desorden motor sea debido al antagonismo reducido por agentes excitadores endógenos, tales como el glutamato o el QUIN (Yamamoto et al., 1994).

#### **3.4.8.6 VIH y Complejo SIDA-demencia**

Existe evidencia de que la vía de la kinurenina está involucrada en la neurotoxicidad asociada con el complejo SIDA-demencia y probablemente otras enfermedades inflamatorias cerebrales (Heyes, 1996). La actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa ha sido medida en cerebros *postmortem* de pacientes con SIDA (Sardar & Reynolds, 1995), relevando un incremento significativo en pacientes con SIDA que manifestaron demencia en comparación con los tejidos de los pacientes con SIDA y de los pacientes con SIDA no demenciales. El incremento de esta enzima lleva a las elevaciones tanto de QUIN como de 3-HK. A este respecto, Chao y colaboradores (1996) han recopilado una gran cantidad de evidencias en la literatura sobre el posible involucramiento del QUIN en la patogénesis del complejo SIDA-demencia. Más aún, el

papel de los NMDAr en este desorden es bien aceptado (Lipton, 1998). En pacientes con el complejo SIDA-demencia los niveles de QUIN en líquido cefalorraquídeo son incrementados por arriba de 20 veces y correlacionados con la disfunción cognitiva y motora (Heyes et al., 1989b, 1991; Martín et al., 1992), aunque se sabe que la cantidad de QUIN en el cerebro de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana puede incrementar hasta 300 veces (Heyes et al., 1998). Cuando los pacientes son tratados con zidovudina, las concentraciones de QUIN declinan en paralelo con el mejoramiento neurológico. Resultados similares son reportados con niños infectados con el virus de inmunodeficiencia humana en quienes el QUIN aumentó cuatro veces en líquido cefalorraquídeo (55.8 nM comparado con los controles de 14.9 nM), volviendo a la normalidad con el tratamiento con zidovudina (Stone et al., 2001). El QUIN encontrado en el cerebro de pacientes con SIDA es probablemente originado por células activadas por el sistema inmune como parte generalizada de la reacción inflamatoria por la invasión viral. Otra evidencia favorable a esta tendencia radica en que los niveles de kinurenina y de QUIN en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana correlacionan con la  $\beta$ 2-microglobulina y la neopterina, los cuales son indicadores de la actividad inmune (Heyes et al., 1992).

#### **3.4.8.7 Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia que afecta a millones de personas alrededor del mundo. Recientemente, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, Guillemin y colaboradores (2005) demostraron que la vía de la kinurenina está sobre regulada en cerebros de pacientes con Alzheimer, lo cual resulta en un incremento en los niveles de QUIN. En el hipocampo de cerebros de pacientes con Alzheimer, tanto la expresión de laIDO como la acumulación de QUIN son detectados en la microglia cortical, astrocitos, y neuronas (Guillemin et al., 2005). Lo que lleva a la conclusión de que el QUIN puede estar involucrado en el patrón de neurodegeneración del Alzheimer, lo cual se sustenta en el hecho de que el oligómero del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{1-42}$ ) - el cual se considera que juega un papel central en la patogenia del Alzheimer (Walsh et al., 2002) - ha mostrado activar la microglia *in vitro*, resultando en la expresión de laIDO y la producción de QUIN en estas células (Guillemin et al., 2003).

#### **3.4.8.4 Esquizofrenia**

Se ha sugerido que la neurotoxicidad evocada por QUIN por la inflamación activada por microglia y macrófagos puede participar en la muerte neuronal durante la infección cerebral (Brew et al., 1995). Así, el incremento tanto en la densidad de la microglia y los niveles elevados de QUIN han sido encontrados en cortes frontales de cerebros *postmortem* obtenidos de pacientes con esquizofrenia (Bayer et al., 1999; Radewicy et al., 1998; Torrey et al., 1998). La disminución en los niveles del triptofano y el incremento en la actividad de la triptofano-2,3-dioxigenasa en corteza frontal de pacientes esquizofrénicos sugieren que la vía de la kinurenina puede estar alterada también en este padecimiento (Miller et al., 2004).

#### **3.4.8.9 Otras enfermedades inflamatorias**

Se han encontrado incrementos marcados en la concentración de QUIN tanto en líquido cefalorraquídeo como en cerebros *postmortem* de pacientes con enfermedades inflamatorias (bacteriales, virales, fúngicas y parasitarias, meningitis, enfermedades autoinmunes y septicemia). Las correlaciones de QUIN, KYNA, y L-kinurenina con marcadores de estimulación inmune (neopterina, conteo de células blancas y niveles de IgG) indican una estrecha relación entre la vía de la kinurenina acelerada y la estimulación inmune intracerebral (Heyes, 1993). Adicionalmente los niveles de QUIN en cerebros de niños con un rango de infecciones bacteriales del sistema nervioso central correlaciona con marcadores de activación inmune como neopterina (Heyes et al., 1995). En monos *Rhesus*, la septicemia fue asociada con un incremento tanto en suero como en el líquido intracerebral de QUIN y kinurenina (Heyes & Lackner, 1990). Ratones infectados con el virus de *Herpes simplex* tipo 1 desarrollaron parálisis con un aumento en los niveles de QUIN. La infección fue acompañada de un incremento en la actividad de laIDO y la kinurenina hidroxilasa (Reinhard, 1998).

### **3.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO**

Diversos desórdenes neurodegenerativos - incluyendo la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis amiotrofica lateral - muestran

características comunes que involucran la vulnerabilidad de las células neuronales a las diferentes acciones nocivas de las ERO/ERN, que finalmente resultan en estrés oxidativo y nitrosativo. Las ERO/ERN son responsables de las alteraciones estructurales y funcionales de diversas biomoléculas, lo cual se sustenta en que hay evidencia de que los radicales libres y las moléculas reactivas son mediadores potenciales de necrosis y apoptosis por iniciación de diferentes cascadas que involucran vías de transcripción y respuesta inflamatoria.

El estrés oxidativo es comúnmente descrito como la producción de una serie de eventos tóxicos celulares y moleculares producidos por radicales derivados del oxígeno y otras moléculas reactivas. Las ERO son definidas como entidades moleculares que reaccionan con componentes celulares, resultando en alteraciones en su función. Las ERO incluyen tanto a radicales libres (los cuales contienen uno o más electrones desapareados tales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )), como a otras especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ). Las ERO son generadas como bioproductos del metabolismo redox normal durante la reducción metabólica incompleta del oxígeno a agua. El estrés nitrosativo se refiere a una serie de eventos tóxicos producidos a nivel celular y molecular por radicales derivados del nitrógeno y moléculas reactivas como el  $NO^{\cdot}$  y el  $ONOO^{\cdot}$ , entre otros (Santamaría & Jiménez 2005). El SNC es particularmente vulnerable a las acciones tóxicas de las ERO/ERN debido principalmente a tres razones: 1) la alta proporción de lípidos en el cerebro en comparación con otros órganos; 2) por el elevado metabolismo cerebral, ya que el metabolismo aeróbico es la mayor fuente de energía para las células neuronales. La amplia distribución de mitocondrias en células neuronales necesariamente involucra el metabolismo oxidativo y la síntesis de ATP, teniendo un alto riesgo de que la cadena de transporte de electrones conduzca a la formación de  $O_2^{\cdot-}$ . En condiciones fisiológicas normales los sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos (catalasa (CAT E.C. 1.11.1.6), superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.6), glutatión peroxidasa (GPx, E.C. 1.11.1.9), etc.) o no enzimático (glutatión reducido (GSH), ácido ascórbico, etc.) son capaces de remover estas especies. Sin embargo, en condiciones patológicas en donde disminuyen los niveles de actividad y/o expresión de estos sistemas, se incrementan las ERO/ERN, las cuales además de ser tóxicas pueden ser sustratos potenciales para la formación de más especies tóxicas del oxígeno y del nitrógeno. 3) La tercera razón por la cual el SNC es vulnerable a las acciones de ERO/ERN está

relacionada con la limitada actividad de algunas enzimas antioxidantes (como la CAT), o de otros sistemas antioxidantes que están presentes en el cerebro.

El  $H_2O_2$  es un bioproducto concurrente de la actividad de una serie de enzimas, como la monoamina oxidasa y la tirosina hidroxilasa, así como en procesos de auto-oxidación del ácido ascórbico y catecolaminas (Coyle & Puttfarcken, 1993). La activación de fosfolipasas dependientes de  $Ca^{2+}$  liberan ácido araquidónico y la descomposición de la xantina por la xantina oxidasa llevan a la formación de  $O_2^-$ . Adicionalmente, la activación neuronal de la SONn dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina lleva a la formación de ON. Tanto el  $O_2^-$  como el ON tienen gran afinidad por reaccionar entre ellos, formando otras especies altamente reactivas como el  $ONOO^-$ , y este conduce a la posterior formación del  $\cdot OH$ ; el cual puede ser producido espontáneamente por la lenta descomposición de  $H_2O_2$ , o cuando es acelerado este proceso a través de la reacción de Fenton.

La activación de células gliales en respuesta al daño celular con la participación de daño oxidativo y nitrosativo involucra un rango complejo de respuestas que incluyen un incremento en la expresión de genes que son involucrados en la síntesis de citocinas y ON. Cuando las ERO/ERN son liberadas por la glia en respuesta a la destrucción de células dañadas, estos agentes pueden resultar en una subsecuente neurodegeneración. El  $H_2O_2$  liberado por la activación de la microglia puede ser alterado por las peroxidasas y formar al ácido hipocloroso (HOCl) el cual es sumamente tóxico para las células. Por otra parte, el  $ONOO^-$  formado por la interacción del ON y el  $O_2^-$  resultará en la nitración de residuos de tirosina y en la nitrosilación de cisteínas, tanto de enzimas como de proteínas estructurales (Andersen, 2004).

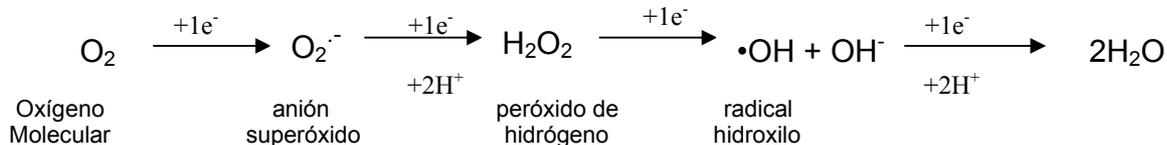
### **3.5.1 Especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERN)**

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente "no radical". La mayoría de los radicales libres de interés clínico son los derivados del oxígeno (Zentella & Saldaña, 1996) ya que éste es la molécula más abundante en los sistemas biológicos. Las EROs son intermediarios tóxicos predominantes y son responsables del estrés oxidativo (Kehrer, 2000). En la siguiente tabla se muestran una lista parcial de las especies reactivas de oxígeno:

| RADICALES                             | NO RADICALES                       |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )   | Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) |
| Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )      | Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )       |
| Radical peroxilo ( $\cdot OOR$ )      | Ozono ( $O_3$ )                    |
| Radical hidroperoxilo ( $\cdot OOH$ ) | Oxígeno singulete ( $^1O_2$ )      |
| Radical alcoxilo ( $\cdot OR$ )       | Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )         |
|                                       | Peróxidos orgánicos ( $ROOH$ )     |

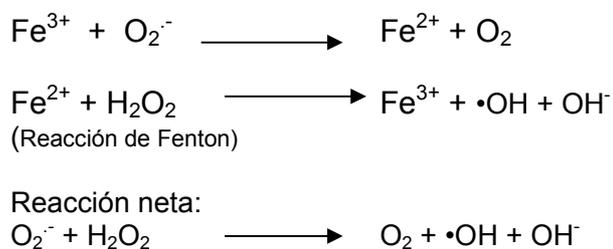
**Tabla 3.** Especies reactivas de oxígeno.

Como lo muestra la tabla, las principales EROs son: el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Una de las principales fuentes de especies reactivas del oxígeno es la cadena respiratoria, donde pueden ocurrir las siguientes transferencias de electrones:



**Figura 4.** Generación de especies pro-oxidantes de la molécula de oxígeno

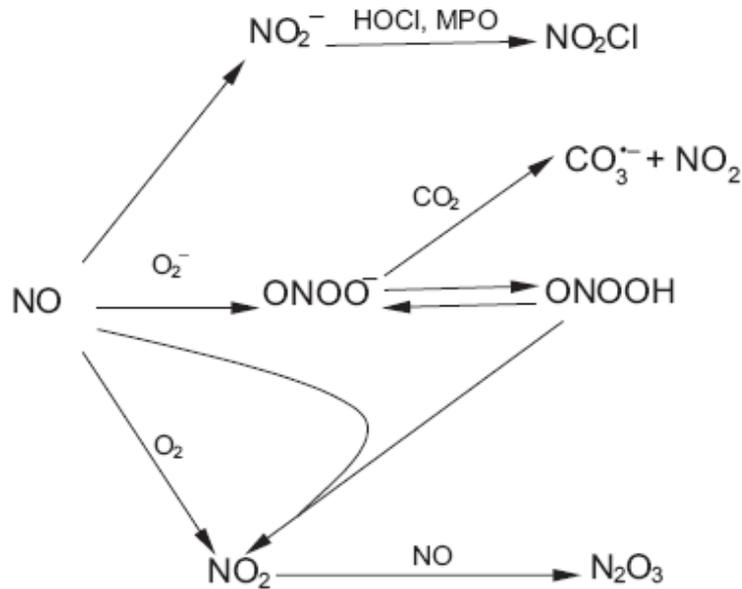
La reacción de Haber-Weiss catalizada por el hierro - la cual hace uso de la química de Fenton - es considerada actualmente como el mecanismo principal por el cual el radical hidroxilo es generado en los sistemas biológicos (Kehrer, 2000).



Hay diversos sitios en la célula que son capaces de generar anión superóxido. Durante la isquemia, la elevación de calcio intracelular activa la fosfolipasa  $A_2$ , y esta enzima libera al ácido araquidónico, con lo que inicia la formación de radicales libres por la ciclo-oxigenasa y la lipo-oxigenasa. La ciclo-oxigenasa cataliza la adición de dos moléculas de  $O_2$  al ácido araquidónico y produce la prostaglandina  $PGG_2$ , la cual es rápidamente peroxidada a  $PGH_2$  con la liberación simultánea del anión superóxido. Otras enzimas que generan anión superóxido son la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. El  $\bullet OH$  es la ERO más activa y es generada por el  $H_2O_2$  a través de la reacción de Haber-Weiss en presencia de iones de hierro, como se mencionó anteriormente. Alternativamente, el  $\bullet OH$  puede ser formado a través del  $ONOO^-$  ya que este se protona rápidamente a ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), y la descomposición espontánea de dicho ácido nos lleva a la generación del  $\bullet OH$ .

Los radicales libres derivados del oxígeno se producen normalmente en el cuerpo humano. Parte de los radicales  $O_2^-$  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: los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos).

Como se mencionó anteriormente, el estrés nitrosativo es generado por la rápida oxidación del ON. El ON puede reaccionar con diversas moléculas (Fig. 5), tales como el oxígeno, EROs, metales de transición y tioles que lo llevan a formar las especies reactivas de nitrógeno (ERN).



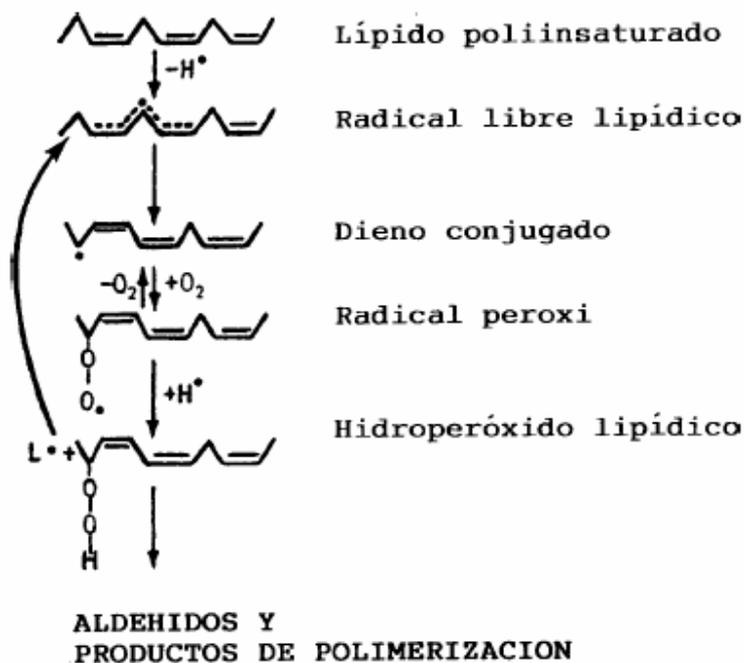
**Figura 5.** Vía general de oxidación del ON y generación de ERN (Soneja et al., 2005).

### 3.5.2 Daño oxidativo

#### 3.5.2.1 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se ha definido como un deterioro oxidativo de los lípidos poli-insaturados, los cuales son constituyentes esenciales de las membranas biológicas. Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo, así como el oxígeno singulete, pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens & Dix, 1991; Choe et al., 1995, Choi & Yu 1995, Gutteridge & Halliwell, 1990; Halliwell & Gutteridge, 1984; Horton & Fairhurst, 1987; Niki et al., 1991; Schaich, 1992). La fase de iniciación comienza cuando el radical libre secuestra un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos de la cadena carbonada para generar un radical libre lipídico ( $\text{L}\cdot$ ). Los ácidos grasos poli-insaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el

enlace C-H metileno. Cuando un radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose así un dieno conjugado que puede reaccionar con el  $O_2$  y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidroperoxido (Fig. 6). El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperoxido, que es un compuesto estable, entra en contacto con iones metálicos de transición y producirá más radicales libres que inician y propagan otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y por tanto, su funcionalidad se ve alterada (Rice-Evans & Burton 1993).



**Figura 6.** Esquema del proceso de la peroxidación de lípidos

### 3.5.3 Antioxidantes en los sistemas biológicos

Las células poseen sistemas de defensa que les permiten controlar la concentración de las especies reactivas. Estos sistemas son de dos tipos: no enzimáticos y enzimáticos.

- Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular (Bandyopadhyay et al., 1999). En esencia, su mecanismo de acción se basa en la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Dentro de estos sistemas no enzimáticos destacan:

- Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Es considerado como el antioxidante más densamente distribuido en los seres vivos. Tiene la capacidad de interrumpir la peroxidación de lípidos en la fase de propagación, reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcoxilos. Al interactuar con los lipoperóxidos se genera un radical  $\alpha$ -tocoferilo el cual es reciclado a  $\alpha$ -tocoferol al interactuar con el ácido ascórbico. Este último tiene la capacidad de interactuar con  $^1\text{O}_2$ , y en menor grado con  $\text{O}_2^-$  (Burton et al., 1982; Halliwell & Gutteridge, 2001).
- Vitamina C (ácido ascórbico). Distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con el anión superóxido y radical hidroxilo (Frei et al., 1990; Sauer et al., 2001), generando radical ascorbilo, el cual es reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tioredoxina/tioredoxina reductasa (May et al., 1998).
- Glutatión (GSH/GSSG): Su forma reducida se considera como un compuesto antioxidante ya que impide la oxidación de los grupos  $-\text{SH}$  de las proteínas; tiene la capacidad de reaccionar con las EROs, transfiriéndoles un átomo de hidrógeno (Halliwell & Gutteridge, 2001).
- Ácido úrico. Tradicionalmente es considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, también posee propiedades antioxidantes; sin embargo, se desconoce el proceso por el cual ejerce su acción protectora. Su mecanismo de acción aparente es el de prevenir la oxidación de la vitamina C y formar complejos con los metales hierro y cobre (Yu, 1994).

- Sistemas antioxidantes enzimáticos

Dentro de los sistemas destinados a convertir las especies reactivas de oxígeno en menos reactivas - antes de que se conviertan en moléculas más reactivas - destacan:

- Superóxido dismutasa (SOD). Es una metaloproteína cuya función es catalizar la dismutación del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . La SOD presenta tres isoformas, de las cuales dos tienen como sitio activo al  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ; una de ellas se localiza en el citosol, en el núcleo y en menor cantidad en el espacio intramembranal, y la otra se ubica extracelularmente en fluidos como el plasma (Oury et al., 1996). La tercera isoforma tiene como sitio activo al  $Mn^{2+}$  y se encuentra en la matriz mitocondrial.
- Catalasa. Es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y las mitocondrias; su papel antioxidante consiste en disminuir el riesgo de formación del radical hidroxilo por la interacción del  $H_2O_2$  con metales de transición vía la reacción de Fenton (Halliwell, 1999). Su mecanismo catalítico tiene lugar en dos fases: en la primera fase se lleva a cabo el rompimiento de una molécula de  $H_2O_2$ , generándose en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de agua; la segunda se caracteriza por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de  $H_2O_2$  (Putnam et al., 2000).
- Glutatión peroxidasa. Es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. La glutatión peroxidasa es eficiente en la degradación de  $H_2O_2$  y requiere de la presencia de GSH para poder llevar a cabo su actividad catalítica (Powers & Lennon, 1999).
- Glutatión reductasa. Enzima que requiere NADPH y cataliza la conversión de GSSG a GSH. Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de esta molécula (Harris & Massey, 1992).

### 3.6 ÓXIDO NÍTRICO

El ON es un mensajero biológico 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 está involucrada en diversas situaciones fisiopatológicas, tales como la inflamación aguda y crónica, la aterosclerosis, la glomerulonefritis y el daño renal.

El ON influye en la liberación de otros neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de proteína cinasas dependientes de GMPc, aumentando así la fosforilación de las proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación de neurotransmisores. Probablemente uno de sus papeles tóxicos más relevantes radica en que el ON se encuentra formando parte de la cadena que liga la activación de los receptores para glutamato del tipo NMDA a la liberación de neurotransmisores en la corteza cerebral o en el estriado (Bogdanov & Wurtman, 1997; Yun et al., 1996).

Es importante mencionar que el efecto directo del ON sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial es la inhibición de manera reversible de la citocromo oxidasa C (Bolaños et al., 1994; Moro et al., 2005), disminuyendo así su afinidad por el O<sub>2</sub> y afectando el flujo de electrones mitocondrial y la síntesis de ATP. Adicionalmente, se sabe que la activación de la glucólisis por ON es independiente de GMPc y requiere de la inhibición de la respiración mitocondrial (Almeida et al., 2004). Los efectos citotóxicos del ON (a altas concentraciones locales) involucran la inhibición de enzimas hierro-sulfuradas de la cadena mitocondrial, incluyendo la NADH:ubiquinona oxidoreductasa, la NADH:succinato oxidoreductasa y la aconitasa (Nathan, 1992). Por otra parte, la activación independiente de GMPc por ON de otras enzimas, tales como la ciclooxigenasa, ha sido ampliamente reportada. Esta acción puede ser relacionada con la reacción que ocurre entre el ON y el centro hemo-hierro del sitio activo de las enzimas (Salvemini & Masferrer, 1996). El ON inhibe la actividad del citocromo P-450 y puede también regular genes de transcripción: en células endoteliales activa c-fos (Felley-Bosco et al., 1994), mientras que en neuronas potencia el efecto del calcio en la expresión de genes primordialmente promotores de c-fos (Peunova & Enikolopov, 1993).

### **3.5.1 Sintetasas de óxido nítrico**

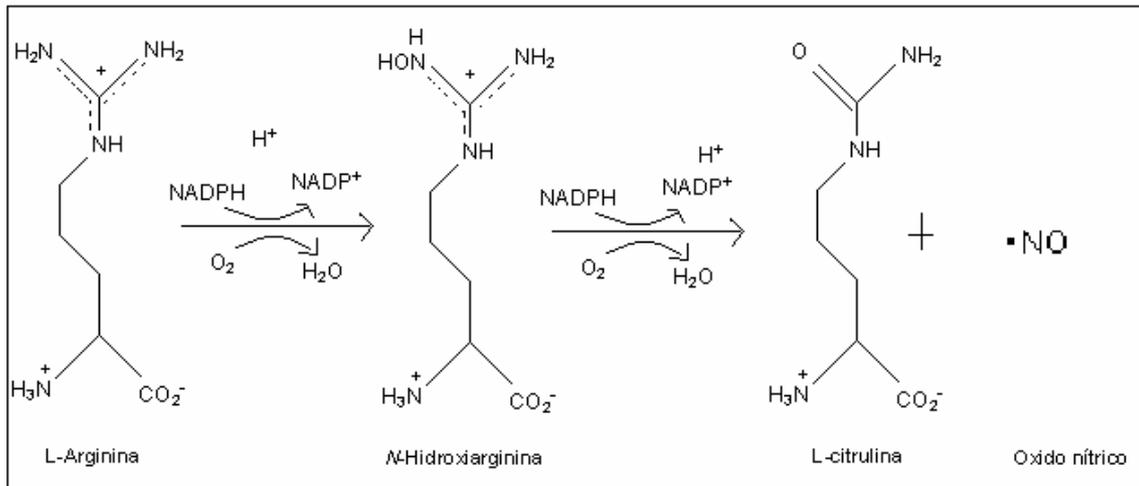
La síntesis de ON es catalizada por las sintetasas de óxido nítrico (SON), una familia de proteínas que constan de tres isoformas (Tabla 4). La SON neuronal (SONn) y la SON endotelial (SONe) son consideradas constitutivas y su actividad está regulada principalmente a nivel post-transduccional. La isoforma SON inducible (SONi) se expresa

en varios tipos celulares, tales como macrófagos y células del músculo liso vascular, en respuesta a ciertos estímulos por citocinas o productos bacterianos (Nathan & Xie, 1994).

|                        | <b>NOSn<br/>Tipo I</b>                        | <b>NOSi<br/>Tipo II</b>                    | <b>NOSe<br/>Tipo III</b> |
|------------------------|---|--|--------------------------|
| Dependencia de calcio  | Dependiente                                   | Independiente                              | Dependiente              |
| Principal tipo celular | Neuronas y glía                               | Macrófagos                                 | Células<br>endoteliales  |
| Cromosoma (humano)     | 12q24.2                                       | 17cen-q12                                  | 7q35-36                  |
| Transcripción          | Constitutiva<br>Inducible en<br>algunos casos | Inducible<br>Inducible en<br>algunos casos | Constitutiva             |

**Tabla 4.** Principales características de las tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico.

Las isoformas de la SON catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina y ON dependiente de NADPH y oxígeno molecular (Fig. 7). Estas enzimas son flavohemoproteínas diméricas cuyo monómero está compuesto de un dominio oxigenasa N-terminal que posee un mol equivalente de hemo y sitios de unión para L-arginina y la (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), además de un dominio reductasa terminal que contiene un mol equivalente de flavina adenina dinucleótido y flavina mononucleótido (FMN), y que une NADPH (Griffith & Stuehr, 1995; Stuehr, 1997). Los dominios oxigenasa y reductasa están enlazados por una secuencia de unión a calmodulina (CaM); la unión de CaM facilita la transferencia de electrones del dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa (Cho et al., 1992), y también aumenta la velocidad de transferencia de electrones a través de las flavinas (Abu-Soud et al., 1994).



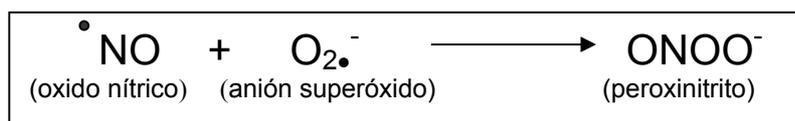
**Figura 7.** Síntesis de óxido nítrico por las sintasas de óxido nítrico.

Las actividades de las SONE y la SONn son reguladas por la unión de CAM, la cual a su vez es controlada por los niveles de calcio intracelular inducidos por agonistas, y es mediada por una secuencia autoinhibitoria en la región de la FMN en el dominio reductasa. También son directamente reguladas por la síntesis de BH<sub>4</sub> y por otras proteínas a través de la unión directa con la SON (Matsuda et al., 2000).

### 3.7 PEROXINITRITO (ONOO<sup>-</sup>)

#### 3.7.1 Formación

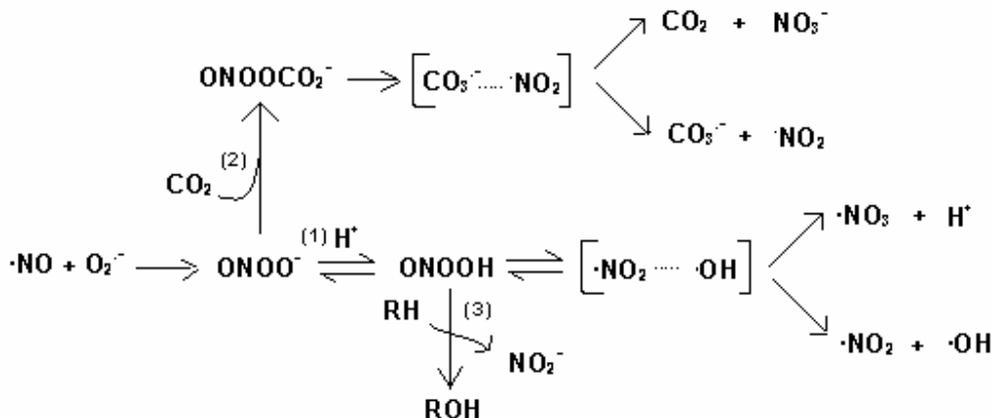
La generación simultánea de ON y superóxido favorece la producción del anión ONOO<sup>-</sup> (Fig. 8) (Beckman et al., 1990). La reactividad oxidante del peroxinitrito es mediada con la actividad biológica del radical hidroxilo.



**Figura 8.** Formación del ONOO<sup>-</sup>

La constante de reacción del ON con el anión superóxido es de  $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Radi), indicando la competencia del ON con la SOD por el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . El peroxinitrito está en equilibrio rápido con su forma protonada, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) ( $\text{pKa} = 6.8$ ). Ambas especies existen *in vivo*, predominando la forma aniónica a pH 7.4. Tanto la forma aniónica como la protonada del peroxinitrito son capaces de atravesar, por diferentes mecanismos, las biomembranas (Denicola et al., 1996).

El peroxinitrito reacciona rápidamente con el dióxido de carbono presente en sistemas biológicos, conduciendo así a la formación de radicales secundarios tales como los radicales carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ). Finalmente, una pequeña fracción de peroxinitrito se homoliza, dando lugar a la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) (Fig. 9). Adicionalmente, la deficiencia de  $\text{BH}_4$  puede desencadenar la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y/o  $\text{ONOO}^-$  a través del desacoplamiento de la actividad de la SON1 (Abu-Soud et al., 1997; Vásquez-Vivar et al., 1999). Por otra parte, el  $\text{ONOO}^-$  puede ser sintetizado después de una persistente inhibición de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial por ON (Poderoso et al., 1996; Clementi et al., 1998).



**Figura 9.** Rutas de formación y descomposición de peroxinitrito en sistemas biológicos. El peroxinitrito es formado por la reacción controlada por difusión de los radicales óxido nítrico y superóxido (Radi, 2000). El peroxinitrito puede formar, junto con el dióxido de carbono, el anión nitrosoperoxicarboxilato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), un aducto transitorio (2) (Denicola et al., 1996), para luego formar anión carbonato y dióxido de nitrógeno o dióxido de carbono y nitratos (Bonini et al., 1999; Goldstein & Czaoski, 1998; Lehnig, 1999). El ácido peroxinitroso puede oxidar directamente sustratos (3) o descomponerse en una ruptura homolítica a radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y ( $\cdot\text{NO}_2$ ). Los

procesos de nitración (adición de un grupo nitro  $\text{NO}_2$  a una molécula) involucran las reacciones de  $\cdot\text{NO}_2$  con las moléculas blanco.

### 3.7.2 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 significativos de reservorios de antioxidantes y estos son convertidos a disulfuros (Szabo et al., 2002). En sistemas *in vitro*, el peroxinitrito es muy reactivo: se ha reportado dentro de su actividad la rápida oxidación de grupos sulfhidrilos y tioésteres, así como la nitración e hidroxilación de compuestos aromáticos (incluyendo la tirosina, el triptofano y la guanina). La oxidación de grupos sulfhidrilos es responsable de la inhibición mitocondrial, de la aconitasa citosólica y de otras enzimas críticas en la cadena respiratoria mitocondrial (Hausladen & Fridovich, 1994). Mientras la reacción con grupos sulfhidrilos es directa con el  $\text{ONOO}^-$ , la nitración de tirosina probablemente esté asociada con la formación del catión nitrosonio ( $\text{NO}_2^+$ ) intermediario.

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, la aconitasa, causando así una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP. Estos efectos, a su vez, tienen un impacto directo 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  $\text{ONOO}^-$  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 5.

Varias reacciones del peroxinitrito ocurren cuando esté reacciona con enzimas, macromoléculas y lípidos, mostrando así influencia sobre funciones celulares. En primera instancia, la nitración de tirosina puede llevar a la disfunción de las proteínas nitradas como se ha sugerido en el caso de la superóxido dismutasa, la tirosina hidroxilasa neuronal, el citocromo P450 y la prostaciclina sintasa (Greenacre & Ischiropoulos, 2001). Es importante resaltar que el  $\text{ONOO}^-$  puede inhibir a la superóxido dismutasa (Ischiropoulos et al., 1992; Yamakura et al., 1998), la glutarredoxina (Aykac-Toker et al., 2001) y a otras moléculas y sistemas antioxidantes como el glutatión (Cuzzocrea et al.,

1998). El ONOO<sup>-</sup> también puede ocasionar daño a nivel genético por rupturas y desaminación del ADN (Rojas-Walker et al., 1995).

La reacción del peroxinitrito con los lípidos lleva a la peroxidación (formación de malondialdehído y dienos conjugados) y a la formación del nitro-nitroperoxo- y/o oxidación de aductos de lípidos nitrados (Rubbo et al., 1994).

La nitración de residuos de tirosina es considerada como un marcador bioquímico de la producción de OONO<sup>-</sup> *in vitro* e *in vivo* (Beckman et al., 1994). La detección de 3-nitrotirosina se ha establecido como un marcador del incremento de la nitración de tirosina en una gran variedad de enfermedades (Greenacre & Ischiroropoulos, 2001). La tirosina también puede ser nitrada por el ONOO<sup>-</sup> y formar 3-nitrotirosina (Ischiropoulos et al., 1992), y este fenómeno puede desacoplar diversas funciones celulares. La deficiencia en la SOD-Cu/Zn causa la incapacidad de las neuronas de eliminar el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, aumentando así la formación de ONOO<sup>-</sup> (Oury et al., 1992). Se ha observado que en pacientes con esclerosis amiotrófica lateral se expresa una mutante no funcional de la SOD-Cu/Zn; estos pacientes muestran un aumento en la 3-nitrotirosina (Rosen et al., 1993; Beal et al., 1997), sugiriendo el involucramiento del ONOO<sup>-</sup> en la patogénesis de este desorden (Beckman et al., 1993; 2001). En el hipocampo de cerebros *postmortem* de pacientes con Alzheimer hay una gran correlación entre el depósito del β-amiloide y la nitración de un gran número de proteínas (Sultana et al., 2006), sugiriendo que la modificación de proteínas por ONOO<sup>-</sup> puede estar involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades neurológicas (Beckman et al., 1990; Lipton et al., 1993; Bonfoco et al., 1995).

| Acción   | Mecanismo  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A nivel molecular</i></li> </ul> Inhibición de enzimas citosólicas.<br>Inhibición de bombas de membrana.<br>Inhibición de enzimas antioxidantes.<br>Alteraciones en la transducción de señales.<br>Daño al ADN<br>Activación de metaloproteinasas. | Oxidación, nitración<br>Oxidación, nitración<br>Oxidación, nitración<br>Oxidación, nitración<br>Oxidación, nitración, desaminación, formación de aductos.<br>S-glutoxidación de pro-metaloproteinasas. |

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

**Tabla 5.** Procesos citotóxicos iniciados por peroxinitrito (Szabo et al., 2002).

Actualmente se están desarrollando estrategias para disminuir el flujo o el tiempo de vida del peroxinitrito. Dentro de dichas estrategias destacan tres primordialmente: 1) El bloqueo de la formación de peroxinitrito por limitación del ON o del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ya sea inhibiendo la SON o acelerando la dismutación del superóxido; 2) la competencia estequiométrica de atrapadores de peroxinitrito; y 3) la catálisis de la descomposición de peroxinitrito, llevando así a otros productos (por ejemplo, nitratos y nitritos) (Cuzzocrea et al., 2001).

### 3.8 METALOPORFIRINAS

#### 3.8.1 Generalidades

Como mencionabamos anteriormente, en la actualidad se están estudiando las vías de descomposición del peroxinitrito con especial interés. Se ha reportado que la reacción del  $\text{ONOO}^-$  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, sugiriéndose así a éstas como una nueva clase de catalizadores que descomponen un rango amplio de EROs, tales como el superóxido, el peroxilo, el peroxinitrito y los radicales peroxi-lipídicos.

Algunos factores en las metaloporfirinas, tales como el tipo de centro metálico, el potencial redox y la carga electrostática de estos compuestos, son reconocidos como determinantes importantes en su actividad catalítica de descomposición y potencia. Estos conceptos han conducido al desarrollo de metaloporfirinas con actividad específica mayor que la de las SOD nativas. Las metaloporfirinas más potentes que hasta el momento se han evaluado poseen metales como manganeso o el hierro embebidos dentro del “corazón” de la porfirina; estas porfirinas son conocidas como antioxidantes ya que pueden atrapar un gran número de EROs (Day, 2004; Muscoli et al., 2003; Patel & Day, 1999; Riley, 1999).

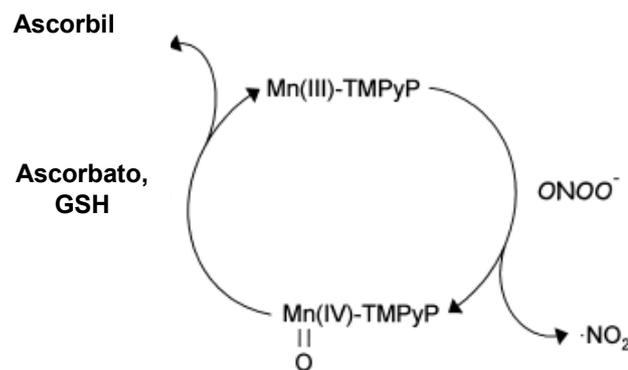
Recientemente, se han descrito un conjunto de metaloporfirinas que catalizan la descomposición de  $\text{ONOO}^-$ . Entre estas tenemos al FeTMS, al FeTPPS, al FeTMPyP, al MnTBAP, al MnTMPyP, etc. Las porfirinas de Mn(III) y Fe(III) muestran efectividad a bajas concentraciones. Sin embargo, dependiendo del mecanismo de reacción, los atrapadores catalíticos pueden no apagar o detener efectivamente a los intermediarios reactivos, por lo que requieren de compuestos celulares (típicamente de antioxidantes como el ascorbato y el GSH) para ser regenerados (Crow, 2000). Porfirinas hidrosolubles de hierro y manganeso presentan una alta reactividad con el  $\text{ONOO}^-$  (Shimanovich & Groves, 2001), además de prevenir el daño oxidativo dependiente de ON en modelos animales y cultivos celulares. Recientemente, estos compuestos han demostrado eficacia en modelos experimentales de isquemia (flujo sanguíneo insuficiente) (Mackense et al., 2001) y de esclerosis lateral múltiple en ratones transgénicos (Wu et al., 2003).

En los últimos años, se ha descrito en detalle la gran afinidad del  $\text{ONOO}^-$  por los metales de transición. La primera indicación de que el peroxinitrito actúa con el Fe del grupo hemo aparece en 1993, cuando Floris y colaboradores reportaron una constante de

$6.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para la reacción del  $\text{ONOO}^-$  con la mieloperoxidasa a un pH de 7.2. En 1996, Stern y colaboradores reportaron que el FeTMPyP descompone el  $\text{ONOO}^-$  a nitrato, y en el mismo año Szabo y colaboradores reportaron que el MnTBAP inhibe la oxidación mediada por el  $\text{ONOO}^-$  *in vitro* y que además previene la inhibición de la respiración mitocondrial en células expuestas a  $\text{ONOO}^-$ . Más aún, estudios en animales han demostrado que porfirinas como el Fe(TMPS) reducen la nitración de residuos de tirosina evocada por peroxinitrito, no observándose protección cuando se utilizó el  $\text{H}_2\text{TMPS}$ ; es decir, la misma 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).

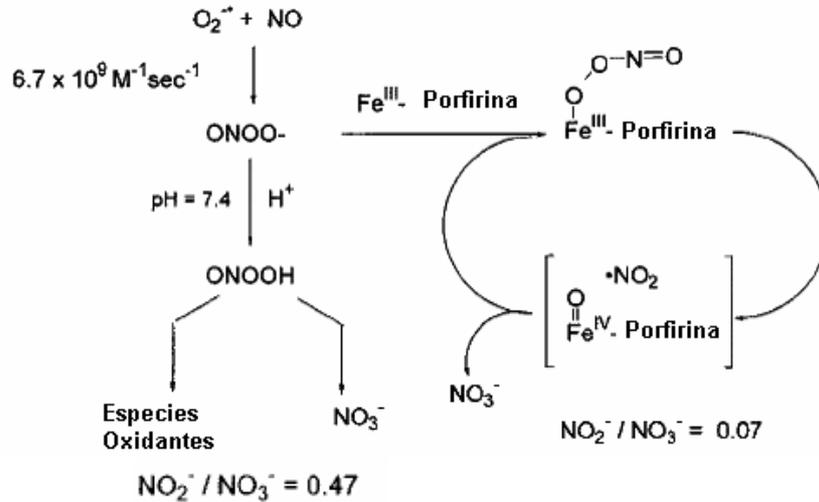
### 3.8.2 Mecanismos de acción

Las porfirinas de Mn(III) son diferentes de las de Fe(III) en los agentes reductores que utilizan. El ascorbato es necesario para reducir el intermediario oxo-Mn(IV) a Mn(III) y de esta manera completar el ciclo (Fig. 10). Afortunadamente la reducción del oxo-Mn(IV) ocurre más rápido que la oxidación por peroxinitrito (Crow, 2000).



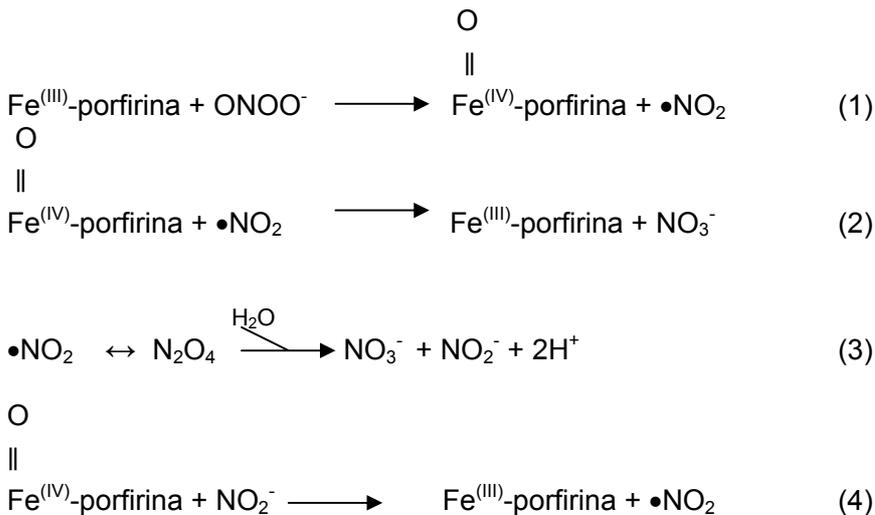
**Figura 10.** Mecanismo de descomposición del peroxinitrito propuesto para las porfirinas de Mn(III) (Crow, 2000). La reacción del  $\text{ONOO}^-$  con porfiratos de Mn(III) produce un intermediario Mn(IV) y el radical dióxido de nitrógeno, y estas dos especies pueden oxidar moléculas que contengan residuos de tirosina; sin embargo, el ascorbato puede limitar este evento mediante la reducción del Mn(IV) a Mn(III) y del  $\cdot\text{NO}_2$  a nitrato, regenerándose así la porfirina y completando el ciclo catalítico.

Por otra parte, las porfirinas de Fe(III) pueden descomponer al ONOO<sup>-</sup> de manera catalítica sin agentes reductores. La reacción entre el ONOO<sup>-</sup> y la porfirina de Fe(III) forma el oxo-Fe(IV); las porfirinas de Fe(III) descomponen el ONOO<sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en mayor proporción, tal y como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Mecanismo de la descomposición de ONOO<sup>-</sup> por porfirinas de Fe(III) (Salvemini et al, 1998).

Las siguientes reacciones (Fig. 12) muestran la forma en que la porfirina de Fe(III), al reaccionar con el peroxinitrito, forma un intermediario oxoFe(IV) (1) el cual se puede reducir al reaccionar con el •NO<sub>2</sub> (2) o con el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (4), y formar nitrato. Cuando el oxoFe(IV) reacciona con el •NO<sub>2</sub> libre, es muy rápido comparado con el NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. El •NO<sub>2</sub> está en constante equilibrio con el N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (3), el cual es una fuente de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Shimanovich & Groves, 2001).

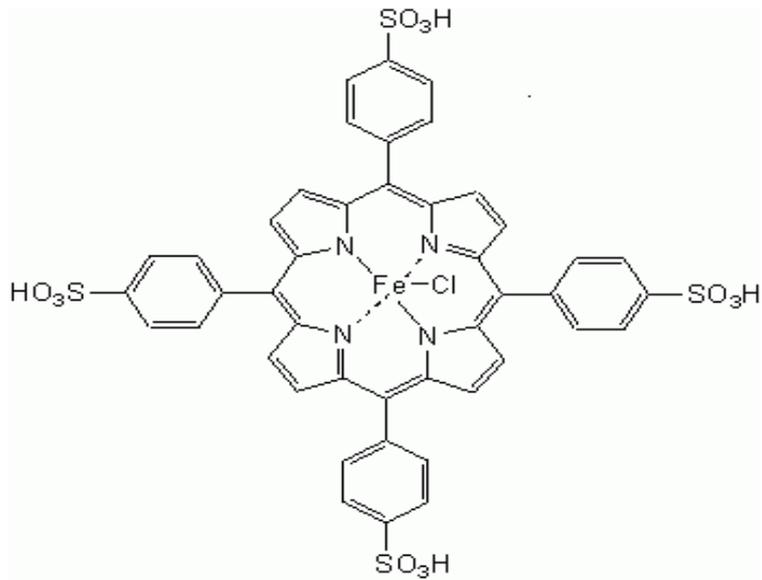


**Figura 12.** Reacciones del ONOO<sup>-</sup> con las porfirinas de Fe(III)

Adicionalmente, las metaloporfirinas han mostrado ser protectoras en una amplia variedad de modelos de inducción de estrés oxidativo *in vitro*, en donde se involucra la generación de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , y  $ONOO^-$ . A nivel micromolar, donde las metaloporfirinas parecen no ser tóxicas, éstas protegen a las células contra la toxicidad de generadores de  $O_2^-$  como el paraquat (Day et al., 1995) y la piocianina (Gardner et al., 1996), y de generadores de  $H_2O_2$  como la glucosa oxidasa (Day et al., 1997) y el  $ONOO^-$  producido por endotoxinas (Szabó et al., 1996a), o de  $ONOO^-$  solo (Misko et al., 1998). En consecuencia, las metaloporfirinas son potentes inhibidores de la peroxidación de lípidos (Day et al., 1999). Un claro ejemplo del potencial terapéutico experimental de las porfirinas se aprecia con el MnTBAP, el cual suprime la respuesta inflamatoria además de disminuir los niveles de 3-NT de manera concentración dependiente en un modelo de pleuresia de pulmón (Cuzzocrea et al., 1999b).

### **3.8.3 5,10,15,20-tetrakis (4'-fenilsulfonato) porfirinato de Fe(III) (FeTPPS)**

En particular, el FeTPPS (Fig. 13) 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 inflamaciones agudas (Salvemini et al., 1998) y que tiene efecto protector frente al  $ONOO^-$  generado endógenamente en células RAW 264.7 y en cultivos de neuronas hipocampales expuestas a citocinas (Misko et al., 1998). De igual manera, se ha probado en modelos de daño renal inducido por cisplatino, 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 $\kappa$ B- $\alpha$ , el inhibidor del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B - 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- $\alpha$ , el cual inicia y magnifica el proceso inflamatorio (Lancel et al., 2004).



**Figura 13.** Estructura del FeTPPS

Adicionalmente, el FeTPPS 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 de dopamina inducida por esta toxina (Imam et al., 2000). Recientemente, este catalizador fue utilizado en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas, donde produjo neuroprotección al disminuir los niveles de  $\text{ONOO}^-$ , 3-nitrotirosina, apoptosis y daño al ADN (Thiyagarajan et al., 2004).

Un estudio más reciente muestra que el FeTPPS previene el daño al ADNm inducido por el palmitato, así como su citotoxicidad (Rachek et al., 2006). Cuzzocrea y colaboradores (2006) mostraron que el FeTPPS previene la contractilidad aórtica y la disfunción endotelial inducidas por LPS, sugiriendo así que la formación de  $\text{ONOO}^-$  juega un papel importante en estos modelos experimental.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En consideración a las evidencias que anteriormente mencionamos y que establecen que la generación de especies reactivas, tanto del nitrógeno como del oxígeno, desempeñan un papel crucial en las alteraciones neuroquímicas, moleculares y conductuales de diversas patologías del SNC, en especial en la EH, el propósito de este estudio es caracterizar la participación de  $\text{ONOO}^-$  producido por el QUIN y sus respectivos mecanismos tóxicos a través de la formación de esta especie. El empleo del FeTPPS para este propósito nos permitirá descifrar el grado de participación del  $\text{ONOO}^-$  en los diferentes componentes tóxicos a nivel experimental, a través del modelo excitotóxico evocado por QUIN. Con la correspondiente caracterización de la participación del peroxinitrito en el patrón de daño neuronal inducido por el QUIN, pretendemos aportar información relevante sobre los mecanismos de daño celular evocados por esta toxina y las implicaciones de la formación temprana de esta especie no radical. La consecuente prevención de estos marcadores a través de la degradación del peroxinitrito constituirá, en caso de aportar resultados positivos, una estrategia terapéutica experimental potencial para el manejo de enfermedades con componentes neurodegenerativos, tales como la misma EH.

## **5. HIPOTESIS**

- Si ONOO<sup>-</sup> está involucrado en el patrón de daño excitotóxico evocado por el QUIN, entonces el empleo de un catalizador de su descomposición, como el FeTPPS, atenuará o prevendrá completamente el daño inducido por esta excitotoxina.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la posible participación del ONOO<sup>-</sup> sobre la neurotoxicidad inducida por el QUIN en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington en ratas.

### **6.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar si la infusión estriatal de QUIN y su consecuente neurotoxicidad están relacionadas con la formación de ONOO<sup>-</sup>
- Analizar los efectos del FeTPPS, un catalizador de la descomposición del ONOO<sup>-</sup>, sobre diferentes marcadores de neurotoxicidad inducidos por el QUIN

## 7. MÉTODOS

### 7.1 Materiales y Animales

El QUIN, un estándar de quinina y la apomorfina (APM) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). El Fe(TPPS), la tirosina (TYR) y la 3-nitrotirosina (3-NT) fueron obtenidos de Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Los demás reactivos fueron de grado reactivo y/o HPLC y fueron obtenidos de casas comerciales conocidas. Las soluciones fueron preparadas usando agua desionizada obtenida de un sistema purificador Milli-RQ (Millipore).

Ratas Wistar machos (270-300 g) fueron utilizadas a lo largo del trabajo. Para todos los experimentos propuestos, los animales se agruparon en 5 por cada caja de acrílico, alimentados con un producto comercial (Purina Chow) y agua *ad libitum*. Las habitaciones del bioterio fueron mantenidas en condiciones constantes de temperatura ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), humedad ( $50 \pm 10\%$ ), y luz (12:12 ciclo luz:oscuridad).

### 7.2 Preparación de sinaptosomas (experimentos *in vitro*)

Para los experimentos *in vitro*, las fracciones sinaptosomales fueron obtenidas de cerebro completo por centrifugaciones diferenciales, con modificaciones discretas a métodos previamente reportados (Dodd et al., 1981; Santamaría et al., 2001a; Santamaría et al., 2003). A los cerebros completos de las ratas se les agregaron 37 mL de glucosa 0.32 M y se homogenizaron; posteriormente, se centrifugaron a  $1,073 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se obtuvo el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a  $17,172 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado obtenido se resuspendió en 37 ml de HEPES (NaCl 0.1 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.001 M,  $\text{NaHCO}_3$  0.005 M,  $\text{CaCl}_2$  0.001 M y HEPES 0.01 M) a pH 7.4. Finalmente, las fracciones sinaptosomales se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior uso.

### 7.3 Determinación de peroxidación de lípidos en sinaptosomas (experimentos *in vitro*)

La PL fue estimada en vesículas sinápticas de cerebros completos de rata por detección de los productos lipídicos fluorescentes, de acuerdo a un método modificado (Santamaría et al., 1997; 2001a) de un reporte original (Triggs & Willmore, 1984). A  $500 \mu\text{l}$  de la solución conteniendo los sinaptosomas, se les agregaron diferentes concentraciones de FeTPPS ó MnTBAP (Tabla 6).

| Concentración de FeTPPS ( $\mu\text{M}$ ) | Vol. de la solución estandarizada de sinaptosomas ( $\mu\text{l}$ ) | Vol. de ácido Quinolínico 100 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{l}$ ) | Vol. de FeTPPS 2 mM ( $\mu\text{l}$ ) | Vol. de HEPES pH 7.4 ( $\mu\text{l}$ ) |
|---|---|---|---------------------------------------|--|
| <b>Control</b>                            | 500   | ----  | ----                                  | 500                                    |
| <b>0</b>                                  | 500   | 50  | ----                                  | 450                                    |
| <b>10</b>                                 | 500   | 50  | 5                                     | 445                                    |
| <b>25</b>                                 | 500   | 50  | 12.5                                  | 437                                    |
| <b>50</b>                                 | 500   | 50  | 25                                    | 425                                    |
| <b>75</b>                                 | 500   | 50  | 37.5                                  | 462                                    |
| <b>100</b>                                | 500   | 50  | 50                                    | 400                                    |
| <b>250</b>                                | 500   | 50  | 125                                   | 325                                    |
| <b>350</b>                                | 500   | 50  | 175                                   | 275                                    |
| <b>500</b>                                | 500   | 50  | 250                                   | 200                                    |
| <b>750</b>                                | 500   | 50  | 375                                   | 75                                     |

Esta parte se realizó por duplicado en hielo.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 60 minutos. Terminado el tiempo de incubación, a los tubos se les adicionaron 3 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) y se agitaron por 60 segundos. Posteriormente, las muestras se dejaron reposar en hielo protegidas de la luz durante 45 minutos para que se llevara a cabo la extracción, desechando la fase metanólica. Finalmente, la fluorescencia fue determinada en la fase clorofórmica restante en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-50B (Perkin-Elmer Co, Norwalk, CT, EUA), usando las longitudes de onda de excitación y emisión de 370 y 430 nm, respectivamente. La sensibilidad del espectrómetro fue ajustada a 300 unidades con un estándar de quinina (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia (intensidad fluorescente relativa) por mg de proteína. Se recolectaron datos de seis experimentos por grupo.

#### **7.4 Estimación de viabilidad mitocondrial (experimentos *in vitro*)**

La viabilidad mitocondrial fue evaluada en vesículas sinápticas por el ensayo de reducción del MTT, realizando pequeñas modificaciones a reportes originales (Mosmann,

1983; Berridge & Tan, 1993). Este método es comúnmente empleado como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, ya que la formación de sales de formazan ocurre por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de células viables (Masseiu et al., 2004). Se incubaron 400  $\mu$ l de los sinaptosomas en presencia de QUIN (100  $\mu$ M) y diferentes concentraciones de FeTPPS durante 90 minutos a 37°C; posteriormente se adicionaron 8  $\mu$ L de MTT (5 mg/ml) y se dejaron incubando durante 60 minutos a 37°C. Finalmente, se centrifugaron a 12,000 r.p.m. durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y al botón se le agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol ácido para leerse a 570 nm. La cuantificación espectrofotométrica de formazan fue realizada en un espectrofotómetro Genesis 8 ThermoSpectronic a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de reducción de MTT con respecto al control. Se recolectaron datos de seis experimentos por grupo.

### **7.5 Diseño experimental para experimentos *in vivo***

Los animales fueron agrupados en cuatro grupos experimentales (seis ratas por grupo como mínimo), de acuerdo al tratamiento al que fueron expuestos: 1) Control o sham, 2) Fe(TPPS), 3) QUIN y 4) Fe(TPPS) + QUIN. Las ratas de todos los grupos fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) y 30 minutos después recibieron una inyección intraestriatal unilateral (estriado derecho) de un 1  $\mu$ l de QUIN (240 nmol) (grupos 3 y 4) o solución salina (grupos 1 y 2), de acuerdo a reportes previos (Santamaría & Ríos, 1993), siguiendo las coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior a bregma, -2.6 mm lateral a bregma y 4.5 mm ventral a la dura (Paxinos & Watson, 1998). Los animales control (grupo 1) y las ratas tratadas con QUIN (grupo 3) recibieron previamente una inyección intraperitoneal de agua estéril (pH 7.4). El Fe(TPPS) fue disuelto en agua estéril y administrado 2 horas antes de la infusión intraestriatal de QUIN (grupo 4) o salina (grupo 2) a una dosis previamente reportada con un efecto protector en otros modelos neurotóxicos (10 mg/Kg, i.p.) (Imam et al., 2000). Todos los animales fueron sacrificados por decapitación 120 minutos (para ensayos de SON, SOD y lipoperoxidación) o 24 horas (para los ensayos de actividad de caspasa-3 y fragmentación de DNA) después de la infusión estriatal de QUIN. Los estriados fueron disecados en hielo y preservados a -75°C en un REVCO. Grupos adicionales de ratas fueron sacrificados a tiempos variables después de la infusión de QUIN (60, 120, 240 y 360 min) para medir los niveles de ONOO<sup>-</sup>.

## **7.6 Determinación de los niveles de 3-nitrotirosina**

Los niveles estriatales de 3-NT y TYR fueron determinados por HPLC con detección electroquímica, por un método basado en el ensayo descrito por Imam y colaboradores (1999), y adaptado de un reporte original (Crow, 1999). Se empleó un cromatógrafo de líquidos BAS modelo CC-5 acoplado a un detector electroquímico BAS modelo LC-4C. El tejido estriatal fue homogenizado en buffer de fosfatos 0.1 M (10%, p/v), y 0.1 ml del extracto correspondiente fue diluido en 0.5 ml de agua desionizada y ultrafiltrada con ultrafiltros Millipore de 5 kDa. 0.5 ml del filtrado fueron llevados a una bomba de vacío y la fase retenida fue usada para la estimación de 3-NT. Las proteínas retenidas en el extracto ultrafiltrado fueron precipitadas con 10 volúmenes de etanol a 5°C por 1 hora y después centrifugados a 10,000 x g por 5 min. Los precipitados fueron resuspendidos en 100 µl de agua desionizada y la concentración de proteínas fue estimada por un ensayo basado en la unión del colorante azul de Cuomassie brillante G-250 a proteínas (Bradford, 1976), usando albumina de suero bovino como estandar. Las proteínas (100 µg) fueron hidrolizadas a 94°C por 24 horas bajo una atmósfera inerte de 6 N de HCl y 1 % de fenol. Las muestras hidrolizadas fueron resuspendidas en 100 µl de buffer A (el cual contenía acetato de sodio 50 mM (pH 4.8)), y posteriormente centrifugadas a 12,000 x g por 10 minutos. 25 µl del sobrenadante fueron inyectados a una columna PHASE-II ODS (3 µm, 100 x 3.2mm) y eluidos a 1ml/min con 95 % del buffer A más 5 % de metanol. Los niveles de 3-NT (relativos a TYR total) y de TYR fueron estimados y reportados en relación con sus estándares respectivos.

## **7.7 Determinación de la actividad de la sintasa de óxido nítrico**

La participación del ON en el daño oxidativo por QUIN fue analizada indirectamente mediante la técnica desarrollada por Bredt y Snyder en 1990, y modificada por Pérez-Severiano y colaboradores (1998), en la cual se mide la actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON), tanto la dependiente como la independiente de  $Ca^{2+}$ , evaluando la conversión estequiométrica de [ $^3H$ ]-L-arginina a [ $^3H$ ]-L-citrulina más ON. La técnica consiste de los siguientes pasos:

- Preparación de la mezcla de inhibidores de proteasas: leupeptina (1 mg/2 ml), Inhibidor de tripsina (SBTI) (1 mg/ml), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (17.4 mg/ml), aprotinina (2 mg/ml) y Nonidet P-40 (NP40) al 0.1 %.
- A cada muestra de tejido se le agregaron 250  $\mu$ L de la mezcla de inhibidores, y posteriormente el tejido fue homogenizado. Se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry y se incubaron 500  $\mu$ g de proteína durante 30 minutos a 37°C en presencia de los siguientes cofactores (todos a concentraciones finales): L-arg (10  $\mu$ mol/100  $\mu$ l), NADPH (1 mmol/100  $\mu$ l), calmodulina (100 nmol/100  $\mu$ l) y BH<sub>4</sub> (30  $\mu$ mol/100 $\mu$ l), H<sup>3</sup>-L-arg (0.2  $\mu$ Ci/100  $\mu$ l). Los volúmenes finales de reacción fueron ajustados a 100  $\mu$ l con amortiguador de homogenización (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de EGTA y 0.1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7.5). Pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción adicionando 1 ml de una solución amortiguadora de paro (2 mM EGTA, 2 mM EDTA y 20 mM HEPES, pH 5.5). La mezcla de reacción fue transferida a una columna conteniendo 1 ml de resina Dowex-50W previamente equilibrada con una solución de NaOH 1 N. Se dejó fluir el eluido inicial y se agregaron al líquido eluyente 5 mL del líquido de centelleo para su cuantificación en un contador de radiactividad. Los resultados se reportan en ng de L-citrulina/mg de proteína/30 minutos.

### 7.8 Cuantificación de la actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se midió por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley et al., 1984). La actividad de la SOD fue determinada en muestras de tejido estriatal por un método espectrofotométrico previamente descrito (Rodríguez-Martínez et al., 2000; Pedraza-Chaverrí et al., 2001). En cada muestra se utilizaron dos tubos problema y un tubo blanco; además se consideraron 4 tubos adicionales: 2 al principio de la serie y 2 al final de la misma. Estos fueron los tubos del 100 % de reducción. Se preparó la mezcla de reacción (sustratos de SOD) dependiendo del número de muestras que se tenían.

| Sustrato                        | Concentración final |
|---------------------------------|---------------------|
| Xantina                         | 0.122 mM            |
| EDTA                            | 0.122 mM            |
| NBT                             | 30.6 $\mu$ M        |
| Albúmina                        | 0.0006 %            |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 49 mM               |

Es importante señalar que los tubos quedaron distribuidos de la siguiente manera: los tubos 100 % llevaron mezcla de reacción, amortiguador y xantina oxidasa; los tubos blanco de muestra llevaron mezcla de reacción, muestra y amortiguador; y los tubos problema llevaron mezcla de reacción, muestra y xantina oxidasa. Posteriormente, se adicionaron a cada tubo 830  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se incubaron los tubos a 27°C. Inmediatamente después se adicionaron 165  $\mu$ l de amortiguador o de muestra, se agitaron y se adicionaron 33  $\mu$ l de amortiguador o de xantina oxidasa. Toda la mezcla se incubó nuevamente por 15 min. En el momento en el que fueron puestos en el baño de incubación, se agregaron a los tubos 330  $\mu$ l de  $\text{CuCl}_2$  0.8 mM y se dejaron incubar de tal manera que cada tubo de reacción cumpliera 15 minutos de incubación. Finalmente, se midieron las muestras espectrofotométricamente a una longitud de onda de 560 nm. Los resultados fueron expresados en unidades de actividad por mg de proteína.

### **7.9 Peroxidación de lípidos *in vivo***

Este método se desarrolló dos horas después de la inyección estriatal de QUIN a las ratas, utilizando el método fluorométrico de detección de productos de peroxidación modificado por Santamaría y Ríos (1993). El tejido estriatal extraído de cada animal se pesó y homogenizó en 3 ml de solución salina isotónica; de este homogenado se transfirió un mililitro a un tubo de vidrio y se adicionaron 4 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v). La mezcla se agitó y los tubos se dejaron reposar en hielo durante 45 minutos protegidos de la luz. Se desechó la fase metanólica y se midió la fluorescencia de cada muestra en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B, a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 430 nm. La sensibilidad del espectrómetro se ajustó previamente a 300 unidades de fluorescencia con un estándar fluorescente de quinina (0.1  $\mu$ g/ml) en ácido sulfúrico 0.05M. Los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido fresco.

### **7.10 Estimación de la actividad de caspasa-3**

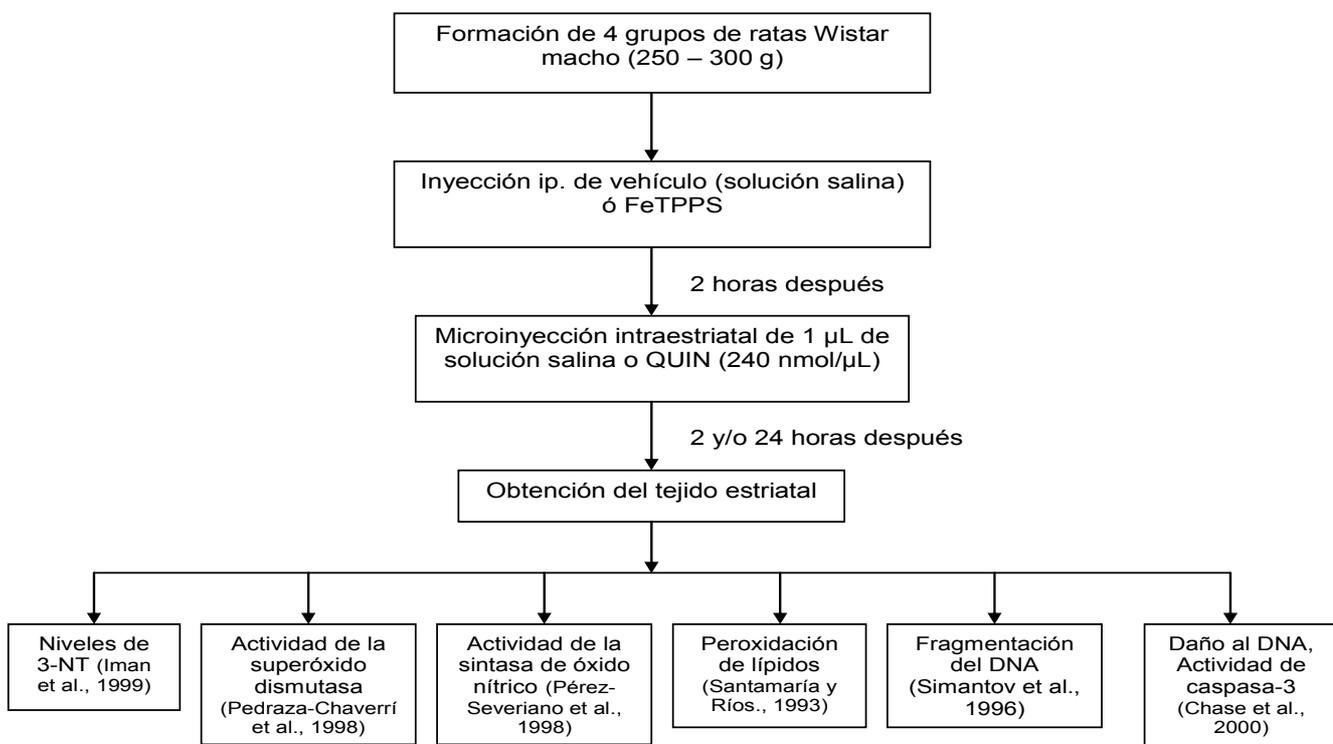
Para la determinación de caspasa-3, el tejido estriatal de todos los grupos fue homogenizado en buffer de lisis (1:1, v/v) con glicerol y preservado a -75°C hasta su empleo. La activación de caspasa-3 fue determinada por un método fluorométrico (Thornberry, 1994) con un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-50B, usando como sustrato el tetrapéptido Ac-DEVD-AMC para detectar la actividad específica de la

caspasa-3. La actividad fue seguida por 5 min después de la adición del sustrato (5  $\mu$ l) y del homogenado estriatal (30  $\mu$ g de proteína) a 3.5 ml de una solución estándar que contenía 100 mM de HEPES + 10 % (p/v) de sacarosa + 0.2 % (p/v) de CHAPS +10 mM de DTT + 1 mM de EDTA + 1 mM de PMSF + 2  $\mu$ g/ml de pestatina + 10  $\mu$ g/ml de leupeptina + 2  $\mu$ g/ml de aprotinina. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia por mg de proteína después de la ruptura del sustrato.

### 7.11 Determinación de la fragmentación del ADN

El ADN fue aislado con el método modificado de un reporte original (Simantov et al., 1996). El tejido estriatal (50 mg) fue homogenizado en 0.5 ml de un buffer de digestión (pH 7.4) conteniendo 10 mM de Tris-HCl + 10 mM de NaCl + 25 mM de EDTA + 1% SDS + proteinasa K (1mg/ml). Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 50°C por 2 horas. Al final de la incubación, 50  $\mu$ l de NaCl fueron adicionados a las muestras y el ADN fue extraído con una mezcla de fenol + cloroformo + alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y centrifugado por 10 min a 3,000 x g. El ADN fue precipitado con 1 ml de etanol (100 %) y centrifugado por 4 minutos a 3,000 x g y resuspendido en un buffer (pH 7.4) que contenía 10 mM de Tris-HCl + 1 mM de EDTA. Adicionalmente, las muestras fueron incubadas con RNasa A (0.5 mg/ml) por 30 minutos. 10 microgramos de ADN de cada muestra fueron cargados en gel de agarosa al 2 % (NuSieve 3:1) conteniendo 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, y posteriormente sometidos a electroforesis para el análisis de fragmentación de ADN detectado con un transiluminador UV.

### 7.12 Diagrama de flujo (experimentos *in vivo*)



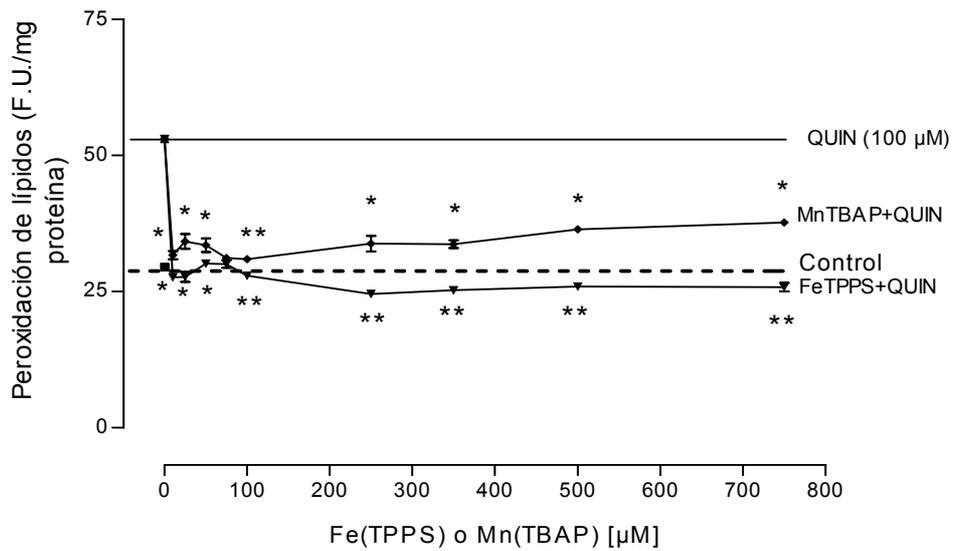
### **7.13 Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron expresados como valores promedio  $\pm$  S.E.M. A los resultados se les aplicó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias, utilizando el software Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Efecto del FeTPPS y del MnTBAP en la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN en sinaptosomas

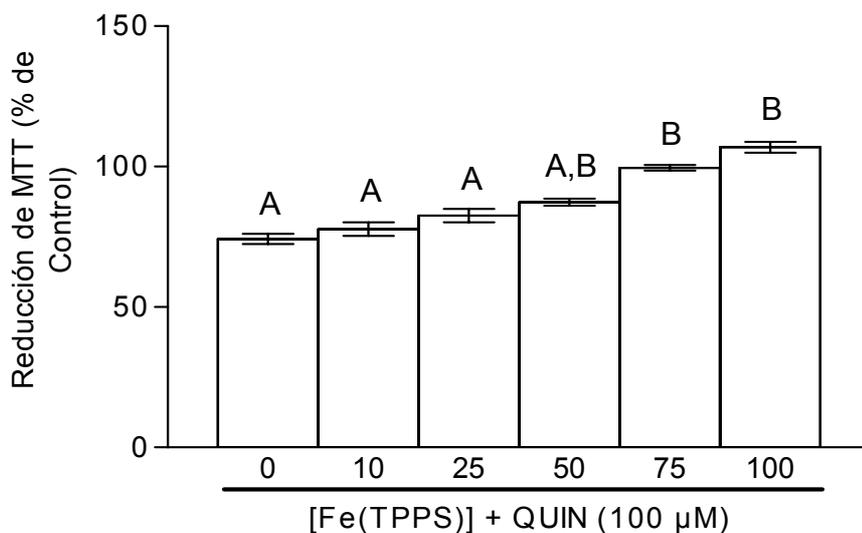
La Figura 14 muestra los efectos del FeTPPS y del MnTBAP, dos conocidos porfirinatos catalizadores de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$ , sobre la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN en terminales sinápticas. La lipoperoxidación fue determinada a través de la formación de productos lipídicos fluorescentes. El QUIN sólo ( $100 \mu\text{M}$ ) produjo un incremento del 80 % en la lipoperoxidación en comparación con los valores del grupo control. Ambos porfirinatos muestran una reducción significativa en la lipoperoxidación inducida por QUIN desde concentraciones bajas ( $10 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, el Fe(TPPS) resultó más efectivo que el MnTBAP para recuperar los niveles basales de la peroxidación en todas las concentraciones probadas. El Fe(TPPS) mostró un efecto concentración-dependiente a concentraciones medias ( $75\text{-}250 \mu\text{M}$ ), mientras que el efecto del Mn(TBAP) resultó más homogéneo en todas las concentraciones utilizadas. No se observó efecto en los niveles basales de PL al adicionar únicamente los porfirinatos a los sinaptosomas (dato no mostrado).



**Fig 14.** Curvas de efectos concentración-respuesta del Fe(TPPS) y Mn(TBAP) sobre la lipoperoxidación inducida por QUIN en sinaptosomas. \*( $P < 0.05$ ) y \*\*( $P < 0.01$ ), diferentes de QUIN; ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

## 8.2 La disfunción mitocondrial inducida por QUIN en sinaptosomas es atenuada por FeTPPS

El efecto de concentraciones crecientes del FeTPPS sobre la disfunción mitocondrial de terminales sinápticas fue medido por la reducción mitocondrial del MTT y se presenta en la Figura 15. Los sinaptosomas incubados con QUIN (100  $\mu\text{M}$ ) mostraron una disminución del 30 % de la reducción del MTT con respecto a los niveles basales. En contraste, el FeTPPS produjo un efecto protector concentración-dependiente en la disminución de la reducción del MTT inducida por el QUIN: mientras las concentraciones de 75 y 100  $\mu\text{M}$  produjeron una recuperación significativa (0.5 % la menor y 6 % la mayor vs. el control, respectivamente), las concentraciones bajas (10-50  $\mu\text{M}$ ) no ejercieron efecto alguno. El Fe(TPPS) por sí sólo no produjo cambios en la reducción del MTT al adicionarlo a las fracciones sinaptosomales (datos no mostrados).

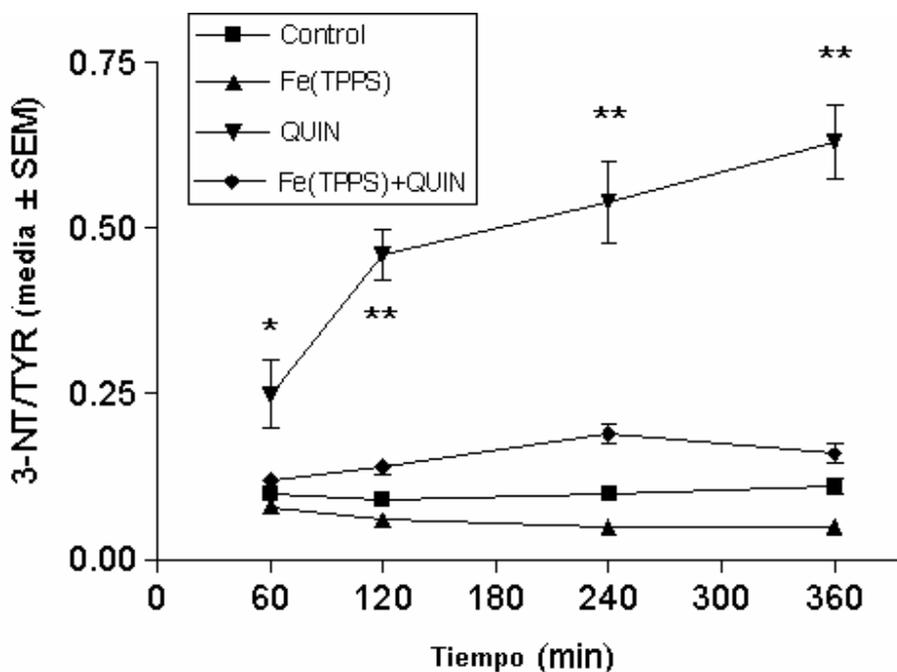


**Fig 15.** Efecto de diferentes concentraciones de Fe(TPPS) sobre la disfunción mitocondrial inducida por QUIN en sinaptosomas. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. de seis experimentos. <sup>A</sup>( $P < 0.01$ ) y <sup>B</sup>( $P < 0.01$ ) diferentes de control (100%) y QUIN, respectivamente. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### 8.3 La formación de 3-NT estriatal inducida por QUIN es prevenida eficientemente por la descomposición del ONOO<sup>-</sup>

El efecto del Fe(TPPS) en la formación del ONOO<sup>-</sup> inducida por el QUIN en el curso temporal es presentado en la Figura 16. Los niveles basales (control) de 3-NT permanecieron sin cambios en todos los tiempos probados, mientras que el QUIN produjo un incremento de 3-NT relacionado con el tiempo que alcanzó niveles significativos desde los primeros tiempos probados y a lo largo del curso temporal (150 %, 410 %, 440 % y 473 % respecto al control a 60, 120, 240 y 360 minutos, respectivamente). Cuando las ratas fueron pre-tratadas con Fe(TPPS), se previno significativamente la formación de 3-NT producida por el QUIN en todos los tiempos probados, resultando en niveles cercanos a los de animales control (20 %, 32 %, 50 %, y 29 % respecto al control a 60, 120, 240, y

360 min, respectivamente). La administración del Fe(TPPS) sólo no produjo efectos en los niveles basales de 3-NT.

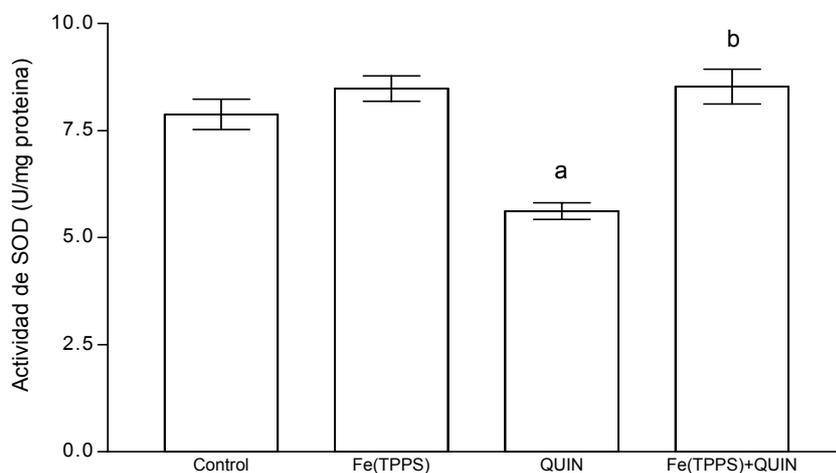


**Fig 16.** Efecto del Fe(TPPS) en un curso temporal de formación de ONOO<sup>-</sup> en tejido estriatal de ratas lesionadas con QUIN. \*(P<0.05) y \*\*(P<0.01), diferentes de QUIN; ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

#### 8.4 Efecto del FeTPPS en la actividad de la superóxido dismutasa en ratas lesionadas con QUIN

La Figura 17 presenta los datos del efecto del Fe(TPPS) como pre-tratamiento, sobre la actividad total de la SOD en el estriado de ratas 2 horas después de la lesión intraestriatal con QUIN (240 nmol/μl). La actividad de la SOD es presentada en unidades de actividad obtenidas del ensayo con NBT. Los animales tratados con QUIN mostraron una disminución significativa en la actividad de la enzima (-29 % vs. el control), y este

efecto fue marcadamente prevenido con el pre-tratamiento con Fe(TPPS) en ratas lesionadas con QUIN (7 % vs. control). La administración del Fe(TPPS) por si sólo no mostró efecto en la actividad basal de dicha enzima.

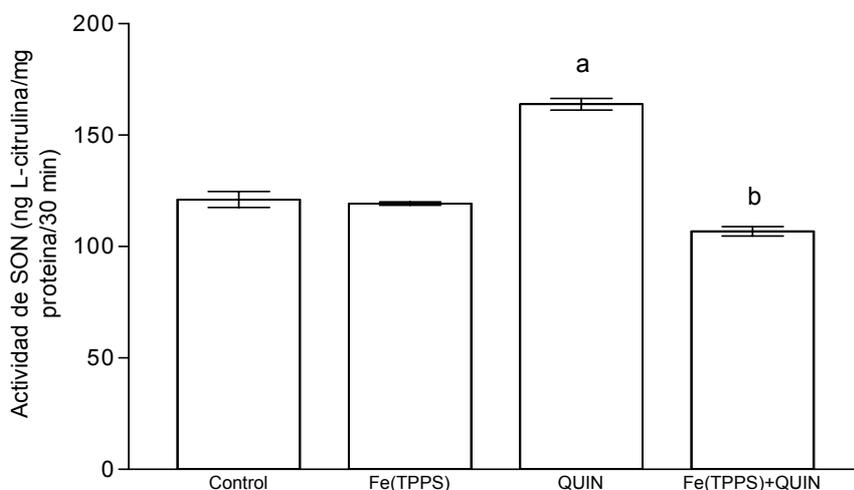


**Fig 17.** Efecto del Fe(TPPS) sobre la actividad total de la SOD en tejido estriatal de ratas control y de ratas lesionas con QUIN. <sup>a</sup>( $P < 0.05$ ) y <sup>b</sup>( $P < 0.05$ ) diferentes de control y QUIN, respectivamente. ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey.

### 8.5 La actividad estriatal de la sintasa del óxido nítrico es afectada por QUIN y restablecida por el empleo del FeTPPS como pretratamiento

La Figura 18 muestra el efecto del FeTPPS sobre la alteración de la actividad de la SON inducida por el QUIN. La L-citrulina formada en el tejido estriatal fue utilizada como

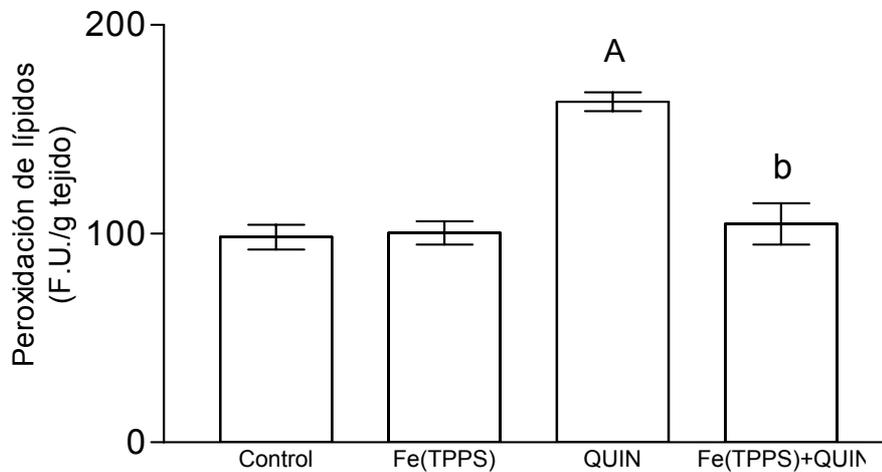
índice de la actividad de SON. El QUIN produjo una marcada actividad estriatal comparada con los animales control (Sham) (35 %), mientras que el Fe(TPPS), administrado 2 horas antes de la infusión del QUIN, redujo esta actividad enzimática a niveles basales (-8 % vs. el control). Estos datos, junto con los de la actividad de SOD (Figura 17), fueron interpretados como una confirmación de que las ratas tratadas con QUIN tienen una marcada tendencia a la producción de  $\text{ONOO}^-$  durante las etapas tempranas de neurotoxicidad.



**Fig 18.** Efecto del Fe(TPPS) sobre la actividad total de SON en tejido estriatal de ratas control y lesionas con QUIN. <sup>a</sup>( $P < 0.05$ ) y <sup>b</sup>( $P < 0.05$ ) diferentes de control y QUIN, respectivamente. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

## 8.6 La peroxidación lipídica estriatal inducida por QUIN es prevenida por la descomposición del $\text{ONOO}^-$

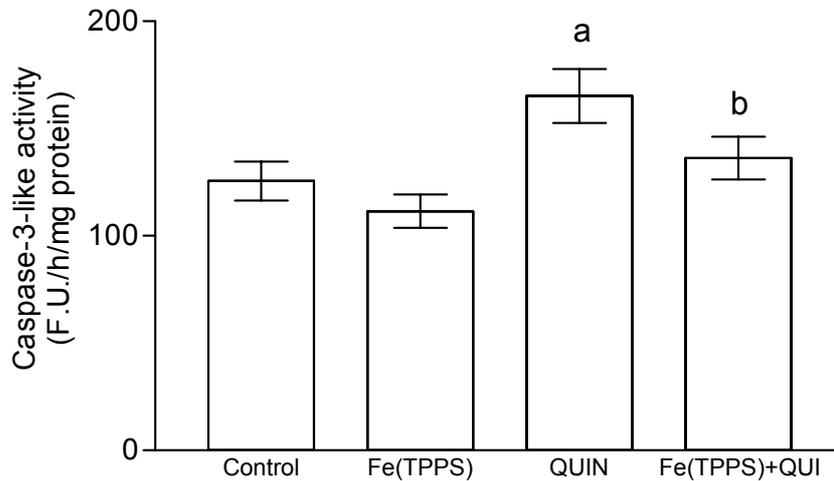
La acción peroxidativa del QUIN y el subsecuente efecto del Fe(TPPS) sobre la lipoperoxidación inducida por la toxina son presentados en la Figura 19. La peroxidación fue determinada por la formación de productos lipídicos fluorescentes 2 horas después de la lesión estriatal. El QUIN aumentó significativamente la lipoperoxidación estriatal en un 66 % comparada con los valores control. En contraste, el pretratamiento con Fe(TPPS) previno la peroxidación inducida por QUIN, recuperando los niveles basales (6 % con respecto al control). La administración del Fe(TPPS) sólo no tuvo efecto sobre la peroxidación basal.



**Fig 19.** Efecto del FeTPPS sobre la lipoperoxidación *in vivo* inducida estriatalmente por QUIN. <sup>A</sup>( $P < 0.01$ ) y <sup>b</sup>( $p < 0.05$ ) diferente de control y QUIN, respectivamente. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### 8.7 La inducción de la actividad de caspasa-3 *in vivo* por QUIN es reducida por el FeTPPS

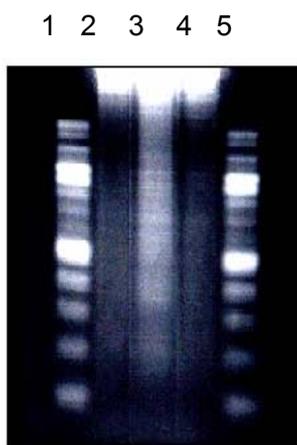
La Figura 20 presenta los datos de la actividad estriatal de caspasa-3 de ratas tratadas con QUIN y Fe(TPPS) + QUIN. La caspasa-3 fue determinada 24 h después a la lesión estriatal de los animales usando el tetrapéptido Ac-DEVD-AMC como sustrato específico. Las ratas infundidas con QUIN mostraron un incremento del 32 % en la actividad de la caspasa-3 cuando lo comparamos con animales Sham, mientras que la administración del Fe(TPPS) a ratas lesionadas con QUIN disminuyó significativamente (pero no previene completamente) este efecto (10 % vs. valores control). Los animales tratados con Fe(TPPS) sólo no mostraron efecto en los niveles basales de la actividad de caspasa-3.



**Fig 20.** Efecto del Fe(TPPS) sobre el incremento en la actividad de caspasa-3 inducida por QUIN. <sup>a</sup>( $P < 0.05$ ) y <sup>b</sup>( $P < 0.05$ ) diferentes de control y QUIN, respectivamente. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### 8.8 Efecto del FeTPPS en el patrón de fragmentación de ADN inducido por QUIN

El efecto del Fe(TPPS) en el patrón de fragmentación de ADN producido por QUIN en tejido estriatal de ratas es mostrado en la Figura 21. Las muestras de tejido estriatal fueron colectadas 24 horas después de la lesión estriatal y fueron preparadas y sometidas a electroforesis para el análisis de ADN genómico. Los animales control (línea 2) no mostraron una degradación de ADN evidente y no presentaron el patrón de escalera. En contraste, el QUIN (línea 3) produjo un patrón de escalera que permite apenas compararlo con los marcadores (líneas 1 y 5), y éste fue prevenido por el pre-tratamiento con Fe(TPPS) (línea 4). Finalmente, el Fe(TPPS) sólo no tuvo efecto sobre la fragmentación de ADN (dato no mostrado).



**Fig 21.** Efecto del Fe(TPPS) en la fragmentación de ADN internucleosomal inducida por QUIN y detectado por electroforesis en un gel de agarosa. Las líneas 1 y 5 son marcadores de 100 pares de bases del ADN, la línea 2 es el control, la línea 3 es el QUIN y la línea 4 es QUIN + Fe(TPPS).

## 9. DISCUSION

Como sabemos, el  $\text{ONOO}^-$ , si bien no es un radical, produce un amplio rango de efectos tóxicos en sistemas biológicos después de ser formado cuando el  $\text{O}_2^-$  y el  $\text{ON}$  están en una relación equimolar (Virág et al., 2003; Szabó, 2003). Entre estos efectos se encuentran la lipoperoxidación, la inactivación de diferentes enzimas y canales iónicos (llevando a la nitración y oxidación de proteínas), la inhibición de la cadena mitocondrial, y la muerte celular apoptótica y necrótica a bajas y altas concentraciones, respectivamente. El  $\text{ONOO}^-$  también daña al ADN y sobreactiva las PARP, con lo cual consume  $\text{NAD}^+$  y ATP y produce disfunción celular (Virág et al., 2003). Antioxidantes endógenos como el glutatión y otros componentes que contienen cisterna, son también afectados por el  $\text{ONOO}^-$  (Szabó, 2003). La toxicidad del  $\text{ONOO}^-$  es inherente a varios procesos fisiopatológicos involucrados en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Misko et al., 1998), y resulta relevante encontrar agentes capaces de descomponer al  $\text{ONOO}^-$ , dado que éstos constituyen alternativas terapéuticas experimentales contra estos eventos tóxicos. Los efectos citoprotectores de varios atrapadores de  $\text{ONOO}^-$  y catalizadores de la descomposición de esta especie han sido probados en diferentes modelos y bajo un gran número de condiciones tóxicas (Crow, 2003; Thiyagarajan et al., 2004), mostrando respuestas muy prometedoras. Uno de estos catalizadores es el  $\text{Fe}(\text{TPPS})$ , una porfirina de hierro que está mediando la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  a  $\text{NO}_3^-$ , y que ejerce efectos citoprotectores tanto en condiciones *in vitro* (Misko et al., 1999) como *in vivo* (Imam et al., 2000), representando así una herramienta experimental conveniente para evidenciar la participación de  $\text{ONOO}^-$  en modelos de toxicidad central y periférica.

En este estudio nosotros encontramos que la lesión excitotóxica inducida por el QUIN en el estriado de rata genera de manera temprana la formación de  $\text{ONOO}^-$ , ya que observamos que los niveles de 3-NT fueron significativos desde los primeros 60 minutos y hasta los 360 minutos posteriores a la lesión. Las propiedades del  $\text{Fe}(\text{TPPS})$ , un catalizador eficiente de la descomposición del peroxinitrito, fueron suficientes para inducir la prevención en la formación de  $\text{ONOO}^-$  por QUIN en todos los tiempos probados. Adicionalmente, la infusión intraestriatal unilateral de QUIN a ratas produjo una disminución significativa de la actividad de SOD y un contrastante incremento en la actividad de la SON, y estos hallazgos concuerdan con reportes previos de otros modelos excitotóxicos (Rodríguez-Martínez et al., 2000; Ryu et al., 2004). Es de gran importancia

el confirmar la formación de  $\text{ONOO}^-$  a través de estos hallazgos, ya que la combinación del efecto en la disminución de SOD y el incremento en SON resulta en la generación de  $\text{O}_2^-$  y NO, respectivamente, llevando así a la rápida formación del potente oxidante  $\text{ONOO}^-$  y de otras especies reactivas del nitrógeno (Radi et al., 2001; Virág et al., 2003). Esto ya ha sido demostrado en este modelo experimental y en reportes previos (Santiago-López et al., 2004; Ryu et al., 200). En dicho reporte se demostró que otro conocido porfirinato de hierro, el Fe(TPFPP) ejerce efectos positivos sobre la neurotoxicidad inducida por el QUIN Y mediada por  $\text{ONOO}^-$  (Santiago-López et al., 2004), sugiriendo así que la descomposición efectiva del  $\text{ONOO}^-$  es, en efecto, responsable de la recuperación de muchos de los marcadores neuroquímicos y oxidativos de la toxicidad evocada por el QUIN. En el presente trabajo se enfatizó el potencial neuroprotector de los porfirinatos de hierro en modelos excitotóxicos. Sin embargo, los hallazgos intrigantes e interesantes completamente novedosos derivados de este estudios radican en el efecto preventivo que el Fe(TPPS) ejerció tanto en la disminución de la actividad de la SOD como en el incremento de la actividad de SON inducidos originalmente por el QUIN. Nuestra interpretación de estos efectos protectores se detalla en los siguientes mecanismos propuestos: 1) las concentraciones de  $\text{ONOO}^-$  producidas inmediatamente después de la inyección de QUIN pueden estar afectando a estas enzimas tanto funcionalmente como estructuralmente (principalmente a través de una acción oxidativa), por lo cual se incrementa la formación de  $\text{ONOO}^-$  a través de un ciclo de retroalimentación positiva, permitiendo así que el Fe(TPPS) prevenga estas alteraciones tempranas; 2) el Fe(TPPS) puede no ser únicamente un catalizador de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$ , sino también pudiera actuar como atrapador de otras moléculas oxidantes que generalmente estén modificando la actividad de estas dos enzimas; ó 3) la generación simultánea de ambas posibilidades. Con el fin de ayudar a esclarecer este paradigma, nos basamos en las siguientes consideraciones: a) se sabe que el NO compite eficientemente con la SOD por el  $\text{O}_2^-$  (Virág et al., 2003), por lo que favorece la formación de  $\text{ONOO}^-$ ; b) el  $\text{ONOO}^-$  ha mostrado inhibir la actividad de la SOD por nitración y oxidación de residuos de tirosina (MacMillan-Crow et al., 1998); y c) el  $\text{ONOO}^-$  también inhibe otras enzimas antioxidantes (Virág et al., 2003) y crea así un escenario vicioso de formación de ERO/ERN. En particular, las últimas dos evidencias sugieren condiciones primarias de la ineficiente reducción del  $\text{O}_2^-$ , la posible disposición del ON y la consecuente formación de  $\text{ONOO}^-$  en un ciclo nocivo. Sin embargo, el mecanismo preciso involucrado en el efecto preventivo del Fe(TPPS) sobre la toxicidad del QUIN requiere de más investigaciones.

La lipoperoxidación causante de daño oxidativo fue incrementada por el QUIN en fracciones sinaptosomales de cerebro completo y en estriado de ratas infundidas con la toxina, y este efecto fue significativamente prevenido por el Fe(TPPS), tanto en el protocolo *in vitro* (donde el rango similar de concentraciones micromolares reportadas por Misko y colaboradores (1998) resultó citoprotector, y en nuestro protocolo *in vivo* (una dosis similar a la reportada por Imam y col. en 2000 resultó neuroprotectora). Los niveles incrementados de peroxidación en ambas preparaciones biológicas no sólo confirma el efecto nocivo de las ERO/ERN en el patrón de daño excitotóxico causado por el QUIN, reproduciendo así hallazgos previos en este modelo experimental de la enfermedad de Huntington (Santamaría et al., 2001a; Santamaría et al., 2003), sino también sugieren que la prevención por el Fe(TPPS) obtenida en nuestros experimentos se debe a que el ONOO<sup>-</sup> está activamente involucrado en el daño oxidativo inducido por eventos excitotóxicos generados por el QUIN. El ONOO<sup>-</sup> ha sido reconocido ampliamente como un potente agente oxidante (Radi et al., 1991), y este efecto puede ser simultáneo a la formación del radical hidroxilo a partir del ácido peroxinitroso (forma protonada del ONOO<sup>-</sup>).

Aunque el origen del ONOO<sup>-</sup> mediante la formación de ERO/ERN compromete una amplia variedad de reacciones en los diferentes compartimentos celulares, uno de los mayores efectos de esta especie es la disfunción mitocondrial; en este sentido, nosotros encontramos que la disminución de la capacidad reductora de la mitocondria producida por el QUIN en sinaptosomas es también prevenida por el Fe(TPPS) de manera concentración-dependiente y ésto apoya un papel activo de esta fracción celular en el daño excitotóxico mediado por ONOO<sup>-</sup>, lo cual es relevante no sólo porque ayuda a explicar el origen del daño oxidativo, sino también porque involucra un riesgo potencial para una falla energética y la iniciación de una cascada de eventos nocivos, culminando en la muerte apoptótica. De hecho, la mitocondria es reconocida como centro organizador de apoptosis por disparar una secuencia de eventos, incluyendo cambios en la permeabilidad mitocondrial, formación secundaria de ERO/ERN, liberación de mediadores apoptóticos y activación de caspasas, entre otros (Green & Kroemer, 1998). Así, el ONOO<sup>-</sup> es un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial por inactivar los complejos I-III y producir otras alteraciones considerables (Virág et al., 2003), y la mitocondria parece ser un blanco preferencial para esta especie durante la ocurrencia de episodios excitotóxicos. A este respecto, últimamente han cobrado especial interés los descubrimientos de Ryu y colaboradores (2004) quienes demostraron el efecto

neuroprotector del piruvato - metabolito final de la glucólisis, antioxidante y conocido sustrato para el funcionamiento energético celular - en la neurotoxicidad inducida por QUIN. Estos autores vincularon el metabolismo energético en el modelo de la enfermedad de Huntington con la formación de  $\text{ONOO}^-$  (midiendo la expresión de 3-NT) y el incremento de la actividad de la SONi, sugiriendo que la microglia y los astrocitos contribuyen a la neurotoxicidad oxidativa inducida por el QUIN.

Por otra parte, la apoptosis es una vía de muerte celular producida por la toxicidad del  $\text{ONOO}^-$ , cuando esta especie se encuentra en concentraciones bajas; estas alteraciones son comúnmente caracterizadas por la morfología celular, el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática, la despolarización mitocondrial, la producción de oxidantes secundarios, la activación de caspasas y la fragmentación de ADN (Virág et al., 2003). En este estudio, las lesiones excitotóxicas producidas por el QUIN resultan en la activación de caspasa-3 y la fragmentación parcial de ADN a 24 horas después de la infusión de la toxina, y este efecto es claramente mediado por la toxicidad del  $\text{ONOO}^-$  al atenuarse con la administración del Fe(TPPS). Esto sugiere que la inducción de apoptosis por episodios excitotóxicos en el estriado está mediada parcialmente por el  $\text{ONOO}^-$ . Interesantemente, el Fe(TPPS) abatió completamente la fragmentación de ADN, pero sólo tuvo un efecto parcial en la activación de la caspasa-3, sugiriendo así que la muerte apoptótica producida por el QUIN y mediada por el  $\text{ONOO}^-$  también podría ser provocada por otras caspasas, como pueden ser la caspasa-2 y la caspasa-6 (Zhuang & Simon, 2000), aunque recientemente, en la recopilación de Virág (2003), se apoyan nuestras observaciones sobre este punto al demostrar que la apoptosis es mediada por  $\text{ONOO}^-$  en preparaciones biológicas, involucrando la caracterización y activación específica de la caspasa-3. Por su parte, el primer reporte que menciona la fragmentación de ADN por  $\text{ONOO}^-$  fue realizado en timocitos (Salgo et al., 1995), y después fue seguido de la activación de caspasa-3 en células de la línea HL-60 (Virág y Szabó, 1998), así como en un modelo de isquemia-reperfusión (Dohi et al., 2003). Aunque los mecanismos específicos de cómo el  $\text{ONOO}^-$  dispara la apoptosis no han sido elucidados aún, se asume que este proceso involucra a la mitocondria como centro organizador de las vías de muerte celular de manera temprana. Una consideración final a este respecto es la posibilidad de que la necrosis ocurra en nuestro modelo, ya que la necrosis es característica de niveles altos de  $\text{ONOO}^-$  alcanzados en un sistema biológico (Virág et al., 2003), y aunque en este trabajo no fue considerada, su participación requiere de más investigaciones, lo cual explicaría el porqué no se vió un patrón de escalera definido, y

que sugiere que bien podrían estar ocurriendo los dos tipos de muerte al mismo tiempo. Como es sabido, los patrones de muerte necrótica pueden resaltar más que los procesos apoptóticos en los modelos excitotóxicos.

Es importante resaltar que en un estudio paralelo se evaluó la conducta de rotación y los niveles estriatales de GABA bajo el mismo esquema experimental, encontrándose que la administración del Fe(TPPS) a ratas fue capaz de prevenir la conducta rotacional inducida por el QUIN observada 6 días después de la infusión de la toxina, y que constituye un marcador confiable del grado de lesión. Estos hallazgos sugieren que la cascada de eventos disparados por la formación de  $\text{ONOO}^-$  inducida por el QUIN resulta en un patrón complejo de daño neuronal en el estriado que conducen a un modelo de conducta rotacional alterada. Dicha conducta aberrante representa un índice cualitativo del desbalance de la transmisión dopaminérgica entre el hemisferio lesionado y el no lesionado, reportado previamente para este modelo (Santamaría et al., 2003). Este efecto es una clara evidencia de la deficiente respuesta funcional integrativa en los animales lesionados con QUIN. Además, la acción preventiva del Fe(TPPS) en la conducta rotacional inducida por QUIN es indicativa de un grado significativo de preservación celular producido por dicha metaloporfirina, mediante la temprana descomposición del  $\text{ONOO}^-$ , enfatizando así el papel potencial de los catalizadores de la descomposición de esta especie como herramientas terapéuticas. Es de notar que una correlación similar entre las funciones conductuales y neuroquímicas ha sido descrita en el mismo modelo excitotóxico cuando se prueban otros agentes neuroprotectores (Santamaría et al, 1996), incluyendo a otro catalizador selectivo de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$ , el Fe(TPFPP) (Santiago-López et al., 2004).

Finalmente, la relevancia de estos hallazgos puede ser resumida en dos puntos principales: 1) nuestro estudio demuestra la participación activa del peroxinitrito en el patrón de daño neuronal inducido por el QUIN en el cerebro de ratas tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque no profundiza en los mecanismos potenciales que conducen a la formación de la especie radical como consecuencia del daño escitotóxico en el SNC; y 2) los hallazgos de este trabajo proporcionan información relevante sobre el empleo de agentes metabolizadores del peroxinitrito como herramientas terapéuticas experimentales para la prevención y posible tratamiento de eventos neurodegenerativos del cerebro, aunque una caracterización más detallada de los mecanismos de acción de estos agentes deberá realizarse en un futuro cercano.

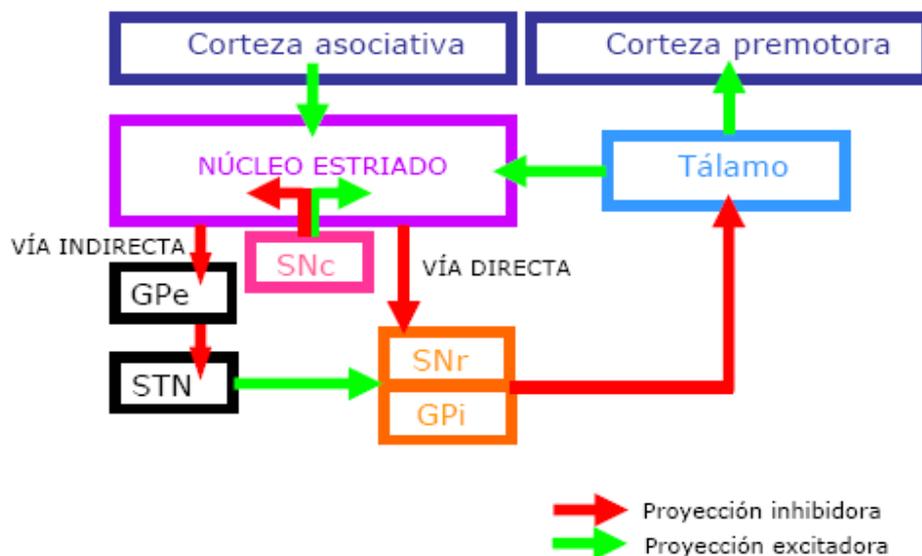
## 10. CONCLUSIONES

1. Las evidencias experimentales derivadas de este estudio demuestran un papel activo del  $\text{ONOO}^-$  en el daño excitotóxico producido por el QUIN en el cerebro de rata, lo cual es deducido por la formación temprana de  $\text{ONOO}^-$  en el estriado y las alteraciones en las enzimas precursoras de  $\text{ON}$  y  $\text{O}_2^-$ , conduciendo así a la formación del  $\text{ONOO}^-$ .
2. El papel que juega el  $\text{ONOO}^-$  en la neurotoxicidad inducida por QUIN fue evidenciado por el efecto protector del FeTPPS – un catalizador selectivo de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  - ejercido en condiciones *in vivo* e *in vitro* en este modelo animal de la enfermedad de Huntington.
3. Es probable que el  $\text{ONOO}^-$  dispare una serie de eventos neurotóxicos mediados por el NMDAr, y ésto incluya un daño peroxidativo temprano, disfunción mitocondrial, activación de caspasa-3 y la subsecuente fragmentación de ADN con daño apoptótico asociado.
4. Este estudio enfatiza la relevancia del estrés oxidativo y nitrosativo en el curso de los eventos excitotóxicos en el SNC, sugiriendo que el uso de catalizadores de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  como herramientas experimentales que atenúen o prevengan eventos neurotóxicos vinculados a procesos neurodegenerativos es una estrategia terapéutica a considerar
5. Estos agentes deben seguir estudiándose en este y otros modelos experimentales de neurodegeneración.

## 11. ANEXO

### 11.1 Ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales altamente interconectados entre sí, e involucrados en el control de la actividad motora. Anatómicamente están constituidos por el núcleo estriado (núcleo caudado y putamen), el globo pálido (segmento interno y externo) y el núcleo accumbens. Funcionalmente existen dos núcleos asociados más, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra. El núcleo estriado es el responsable de integrar la información procedente de diversas zonas cerebrales controlando así en gran medida los movimientos. Principalmente recibe aferencias de la corteza cerebral (vía corticoestriatal) y de la sustancia nigra *pars compacta* (vía nigroestriatal), aunque también recibe aferencias del tálamo y del rafe. Una vez procesada la información, envía eferencias hacia el globo pálido interno y la sustancia nigra *pars reticulata* (vía directa; vía estriatonigral), o a través del globo pálido externo y del núcleo subtalámico (vía indirecta; vía estriatopalidal). Las proyecciones de los ganglios basales se dirigen otra vez al tálamo y después hacia la corteza cerebral (Gerfen, 1992; Smith et al., 1998; Figura 22).



**Figura 22.** Esquema de las aferencias y eferencias del núcleo estriado. En condiciones normales, tanto las proyecciones excitatorias como las inhibitorias se equilibran, pero en condiciones patológicas cuando las neuronas que integran estas vías degeneran, la descompensación del sistema genera graves problemas en el control del movimiento (Graybiel, 2000).

## **11.2 Enfermedad de Huntigton**

### **11.2.1 Antecedentes**

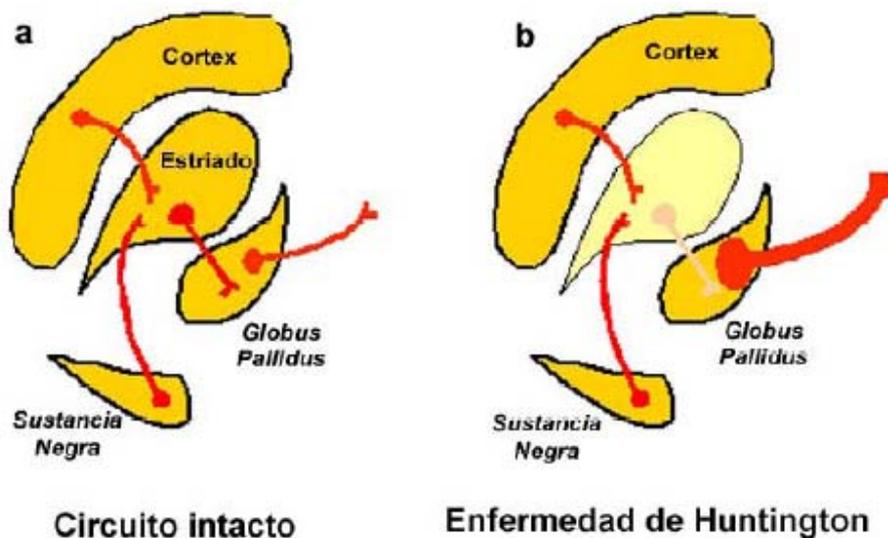
En 1872, George Huntington describió a un grupo de pacientes que tanto su padre como abuelo atendían en East Hampton, Long Island. En esta enfermedad se destacaban principalmente cuatro características: herencia, corea, demencia y muerte después de 15-20 años de haber presentado los síntomas, Este padecimiento tiene una prevalencia de 5-10 afectados por cada 100 000 personas, sin distinción de sexo (Harper 1992).

El trastorno que este médico definió pasó a ser conocido como la enfermedad de Huntington (EH), la cual fue caracterizada clínicamente por alteraciones del movimiento, de la capacidad intelectual y de la conducta. Las alteraciones del movimiento en los primeros estadios de la enfermedad corresponden a una hipercinesia caracterizada por movimientos breves e involuntarios de los músculos de las extremidades, del tronco y de la cara; al presentarse en las piernas ocasionan alteración en la marcha. Cuando llegan a un estadio en el que los individuos se asemejan a las actitudes de bailarines, son llamados movimientos coreiformes, los cuales dan origen al nombre de corea de Huntington. Además de las alteraciones motoras, los pacientes con EH sufren pérdida de memoria, alteración en las funciones intelectuales, disfunciones emocionales y cambios de personalidad.

La enfermedad de Huntington está causada por la expansión del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) en el gen que codifica para la huntingtina, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, traducándose en una repetición de poliglutaminas (polyQ) en el extremo N-terminal de la proteína (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Esta enfermedad es caracterizada por la degeneración de la corteza cerebral y el estriado. Hay una correlación inversa entre el número de tripletes CAG y la edad de aparición de la enfermedad (Persichetti et al., 1995): a mayor número de tripletes, a menor edad aparecen los síntomas de la enfermedad y son más severos. Los pacientes con EH tienen más de 35 repeticiones de CAG (Hannan, 2004), mientras que los tienen entre 70 y hasta 250 repeticiones del trinucleótido CAG se presentan los síntomas en pacientes jóvenes.

El núcleo estriado es el área cerebral más afectada en la enfermedad de Huntington, la cual se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas estriatales, aunque en etapas más avanzadas también se halla afectada la corteza cerebral que se caracteriza por la atrofia de las neuronas piramidales de la capa III, V y VI de la corteza

motora y asociativa (Cudkowicz y Kowall, 1990; Difiglia et al., 1997; MacDonald y Halliday, 2002).. A nivel funcional, la pérdida de las neuronas del núcleo estriado produce disfunciones motoras, mientras que la atrofia de las neuronas corticales sería la responsable de la pérdida cognitiva observada en los enfermos de Huntington (Martin y Gusella, 1986; Ross, 2002). Las neuronas de proyección del núcleo estriado están severamente afectadas (Reiner et al., 1988; Richfield et al., 1995), y en menor grado las interneuronas (Dawbarn et al., 1985; Ferrante et al., 1985; Cicchetti et al., 2000). Las dos subpoblaciones de neuronas de proyección no están afectadas por igual, así, las que proyectan al globo pálido externo son las que primero degeneran (Fig 23) (Reiner et al., 1988), y posteriormente, las que proyectan al globo pálido interno y a la sustancia negra *pars reticulata* (Richfield et al., 1995).



**Figura 23.** Alteración en la circuitería neuronal en la EH. (a) El núcleo estriado juega un papel central en los circuitos de los ganglios basales que controlan el movimiento. (b) En la EH tiene lugar una degeneración inicial de las neuronas GABAérgicas del núcleo estriado que proyectan al globo pálido, que se traduce en una desinhibición de las neuronas palidales

### 11.2.2. Alteraciones bioquímicas de la enfermedad de Huntington

Las alteraciones bioquímicas que se observan en el cuerpo estriado (caudado-putamen) parecen ser aquellas derivadas de la muerte de las neuronas, así que se observa disminución notable de los niveles de GABA y de la enzima que lo sintetiza, la descarboxilasa del ácido glutámico, de acetilcolina y de su correspondiente enzima de

síntesis, la colina-acetil transferasa (CAT), además de la reducción de los niveles de los péptidos localizados en las neuronas espinosas medianas y la disminución del número de los receptores para aminoácidos excitadores localizados en las espinas dendríticas de las neuronas que degeneran (Pasantes et al., 2000). Adicionalmente, los niveles de somatostatina y neuropéptido Y están incrementados más de 3 a 5 veces en núcleo caudado/putamen y globo pálido, sin cambios en otras áreas del cerebro (Schwarcz et al., 1983).

### **11.2.3 Alteraciones neuropatológicas**

La EH se caracteriza neuropatológicamente por la desaparición de las neuronas del núcleo estriado (núcleos Caudado y Putamen). Concretamente hay una muerte selectiva de las neuronas GABAérgicas de proyección de tamaño medio, que constituyen el 95% del total de neuronas de este núcleo (Vonsattel y DiFiglia 1998). Estas neuronas se dividen en dos subpoblaciones. En primer lugar, las que proyectan a la *substantia nigra pars reticulata* y al segmento interno del *globus pallidus*, identificables por la expresión de sustancia P y dinorfina, y que constituyen la llamada vía directa de los ganglios basales. En segundo lugar, las que proyectan al segmento externo del *globus pallidus*, identificables por la expresión de encefalina, y que conforman la vía indirecta de los ganglios basales. Tanto la vía directa como la indirecta son fundamentales en los circuitos que conectan la corteza con los ganglios basales y que, a través del tálamo, vuelven a la corteza cerebral (Gerfen 1992; Graybiel 2000). En la EH se observa una degeneración inicial de las neuronas encefalinérgicas, lo que explicaría los primeros síntomas hipercinéticos, seguido de una degeneración más general en las dos poblaciones estriatales, que correlaciona con la aparición de las acinesias (Reiner et al., 1988; Richfield et al., 1995). Las interneuronas estriatales, por el contrario, no resultan estar afectadas. Paralelamente al deterioro estriatal tiene lugar una disfunción de las neuronas corticales, disfunción que no sabemos hoy en día si es causa o consecuencia de la muerte neuronal en el núcleo estriado (Laforet et al., 2001; MacDonald y Halliday 2002). A medida que avanza la enfermedad tiene lugar la muerte de esas neuronas corticales, sobretodo en las capas III, V y VI de la corteza motora y asociativa (MacDonald y Halliday 2002). En estadios avanzados, la neurodegeneración se extiende al *globus pallidus*, núcleo subtalámico y otras estructuras (Rubinsztein 2002).

### **11.2.4. Modelos experimentales de HD**

Las hipótesis que tienden a explicar la muerte neuronal en la EH implican la alteración en el metabolismo energético, en la función mitocondrial, el estrés oxidativo y la neurotoxicidad; y es muy posible que estas hipótesis sean complementarias. Para intentar esclarecer cualquiera de estas hipótesis se han diseñado diversos modelos de la EH, modelos que siguen diferentes alternativas pero que ninguno de ellos es excluyente del otro. Podemos clasificar a estos modelos en tres grandes categorías que son: los modelos excitotóxicos, los modelos de alteración en el metabolismo energético y los modelos transgénicos.

#### **11.2.4.1 Modelos excitotóxicos**

Regularmente la excitotoxicidad neuronal involucra una elevación fisiológica de las concentraciones de calcio intracelular, en respuesta a una sobre exposición de aminoácidos excitadores como el glutamato. El NMDAr presenta un papel relevante en la neurotoxicidad inducida por los aminoácidos excitadores. Un disturbio en el influjo de calcio puede potenciar vías bioquímicas letales que involucran enzimas degradativas (proteasas y endonucleasas) y/o incrementar la formación de radicales libres (Rami et al., 1997); además, la entrada masiva de calcio a las terminales nerviosas podría aumentar la liberación de aminoácidos excitadores endógenos y propagar así el daño celular por una retroalimentación positiva, llevando a la célula a una muerte apoptótica o necrótica. Estos mecanismos están implicados tanto en desórdenes neurodegenerativos agudos (trauma) como crónicos (Alzheimer y Huntington) (Siesjo, 1981; Choi, 1988; Saito et al., 1993).

Diversas toxinas han sido empleadas para producir un modelo excitotóxico de la EH, entre las cuales se encuentran el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido kaínico (AK), el ácido iboténico y el QUIN. Schwarcz y colaboradores (1983), y Beal y colaboradores (1986) inyectaron intraestriatalmente estas toxinas (Tabla 6) en una concentración conocida para la producción de daño neuronal, y al evaluar las alteraciones morfológicas y perfiles bioquímicos del cuerpo estriado, se encontró que todas estas toxinas disminuían la inmunoreactividad a la sustancia P, a la ACh y al GABA, tal como ocurre en la EH. Sin embargo, el QUIN fue la única toxina que no modificó los niveles de somatostatina y neuropéptido Y, estableciéndose así una selectividad fundamental con respecto a los otros agentes excitotóxicos que sí los afectan, proporcionando así un patrón de toxicidad más específico.

De este último estudio (Beal et al., 1986), se han obtenido las bases para profundizar sobre los efectos del QUIN, postulándolo como la excitotoxina capaz de reproducir más fielmente las características bioquímicas, histopatológicas y conductuales de la EH (Block et al., 1993; Schwarcz et al., 1984; Sanberg et al., 1989; Bruyn & Stoof, 1990; Hantraye et al., 1990).

Tabla 6. Características de los modelos de la EH

| Molécula neuroactiva               | Pacientes (HD) | ratas (KA/IBO) | ratas QUIN | ratas 3-NPA |
|------------------------------------|----------------|----------------|------------|-------------|
| GABA/GAD                           | ↓              | ↓              | ↓          | ↓           |
| Acetilcolina/CAT                   | ↓              | ↓              | ↓          | ↓           |
| Sustancia P                        | ↓              | ↓              | ↓          | ↓           |
| Dopamina                           | —              | —              | —          | —           |
| Somastostatina                     | ↑              | ↓              | —          | —           |
| Neuropéptido Y                     | ↑              | ↓              | —          | —           |
| Encefalina                         | ↓              | —              | ↓          | —           |
| Sobreactivación de Receptores NMDA | ↑              | —              | ↑          | —           |

↑ Aumenta      ↓ Disminuye      — Sin cambios

El QUIN es un metabolito endógeno producido en la vía de la kinurenina, que actúa como agonista del NMDAr (Stone, 1993), y es capaz de producir una despolarización excesiva de la membrana y un influjo de calcio continuo en las neuronas, resultando en severas consecuencias tóxicas. Se sabe que el QUIN produce desórdenes metabólicos diversos, tales como la reducción del consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial, la disminución de los niveles de ATP y NAD, así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon et al., 1997). Entre otros de sus efectos tóxicos en el cerebro destacan: la disminución de GABA, un incremento excesivo de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico, el estrés oxidativo neuronal, la peroxidación de lípidos y la muerte celular

(Foster et al., 1983; During et al., 1989; Santamaría y Ríos, 1993). Además, reproduce el patrón de pérdida selectiva de células neuronales característica de la EH (El-Defrawy et al., 1986; Bordelon et al., 1997).

Adicionalmente, al QUIN se le ha asociado con cáncer (Harman, 1993) a través de la formación de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Dado que se ha demostrado que el QUIN *per se* induce la formación de radicales  $\bullet\text{OH}$  *in vivo* en cuerpo estriado de rata (Santamaría et al., 2001a). Recientes reportes en la literatura involucran al ON y al anión superóxido en el daño inducido por QUIN, sugiriéndose la habilidad del QUIN para producir peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) en el cuerpo estriado de ratas (Ryu et al., 2004; Noack et al., 1998).

Recientemente, se ha enfocado la atención de muchos grupos a la habilidad del QUIN para ejercer acciones neurotóxicas independientes del receptor NMDA, involucrando estrés oxidativo y daño peroxidativo. Estos mecanismos incluyen la formación de complejos QUIN- $\text{Fe}^{2+}$  mediados por la generación de EROs (Goda et al., 1996; Stípek et al., 1997; Murakami et al., 1998; Iwahashi et al., 1999), la alteración en algunos antioxidantes endógenos y la generación directa de radicales hidroxilo en el cuerpo estriado (Santamaría et al., 2001a).

El empleo de creatinina, S-alilcisteína y diversos catalizadores de  $\text{ONOO}^-$  han prevenido el daño oxidativo evocado por el QUIN tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Pérez-de la Cruz et al., 2005). El QUIN también ha sido asociado con desórdenes neurológicos inflamatorios severos, incluyendo el complejo SIDA-demencia (ADC) y la encefalopatía hepática, ya que la producción de este por células monocíticas aumenta en el proceso de inflamación. Existe evidencia de que el QUIN induce la expresión de citocinas en astrocitos, tales como interleucinas y factores tumorales, sugiriéndose así un papel activo de esta toxina en la muerte neuronal mediada por citocinas en desórdenes inflamatorios del cerebro, especialmente los antes mencionados (Pemberton et al., 1997; Croitoru-Lamoury et al., 2003). Adicionalmente, el QUIN está involucrado en infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, meningitis, enfermedades autoinmunes y septicemia (Heyes et al., 1992).

#### **11.2.4.2 Modelo de déficit energético**

Se sabe que el SNC es especialmente vulnerable a las variaciones energéticas, debido tanto al elevado metabolismo que desarrollan las neuronas como a la baja capacidad de almacenar sustratos ricos en energía; por lo tanto, alteraciones en la

capacidad de las neuronas para mantener los niveles normales de energía o simplemente, la necesidad de responder rápidamente a un requerimiento mayor de la misma, pueden disminuir la viabilidad neuronal (Less, 1993). Las alteraciones en el suministro de sustratos ricos en energía provocan paralelamente cambios en la concentración intracelular y extracelular de iones, y con ellos en el potencial de membrana. Estos cambios provocan primordialmente la despolarización de la membrana (Martín et al, 1994). Es de especial interés el ión  $\text{Ca}^{2+}$  en estos procesos, ya que un incremento en este ión nivel citosólico se debe a la liberación del mismo desde sus almacenes intracelulares. En los últimos años se han descrito numerosas enfermedades asociadas al metabolismo energético de la mitocondria, tal es el caso de la EH, en la cual se ha observado disminución del metabolismo para glucosa y oxígeno en los ganglios basales y la corteza cerebral (Beal, 1992). Esta disminución en el metabolismo energético mitocondrial parece deberse a la disminución en la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones (Borlongan et al., 1997; Brenuan et al., 1985). Estos hallazgos se ven apoyados por los estudios ultraestructurales en los que se observan mitocondrias anormales en pacientes tanto jóvenes como adultos mayores de esta enfermedad (Strydom et al., 1994).

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es una micotoxina que causa neurotoxicidad en animales y en humanos (Ludolph et al., 1991). Las lesiones cerebrales causadas por la administración sistémica del ácido 3-NP son altamente específicas del estriado, aunque también se han encontrado en hipocampo, tálamo y corteza cerebral (Borlongan et al., 1997), por lo que ha sido ampliamente utilizado como un modelo de la enfermedad de Huntington (Beal et al., 1993; Borlongan et al., 1997; Brouillet et al., 1999). El mecanismo primario de esta toxina involucra la inhibición de la succinato deshidrogenasa, una enzima localizada en el interior de la membrana mitocondrial y la cual es responsable de la oxidación del succinato a fumarato, llevando a la reducción de la síntesis de ATP y a la muerte neuronal, (Túnez et al., 2004; Coles et al 1979).

La posibilidad de que un defecto en el metabolismo energético pueda resultar en excitotoxicidad fue demostrado por el trabajo de Novelli (1988), quien demostró que los inhibidores de la fosforilación oxidativa o de la Na-K ATPasa, permitían al glutamato ser neurotóxico en concentraciones que ordinariamente no ejercían neurotoxicidad. El mecanismo para este efecto fue una consecuencia en la reducción en el ATP, el cual es crucial para mantener el potencial de reposo normal de la membrana celular (Beal et al., 1994). Estudios de microdiálisis mostraron un incremento no significativo en las

concentraciones extracelulares de glutamato después de la administración de dosis neurotóxicas de 3-NP, en contraste con un marcado incremento en la concentración de lactato (Wullner et al 1994; Beal, 1994). Estos resultados son consistentes con la idea de que el 3-NP causa excitotoxicidad haciendo a las neuronas más vulnerables a los niveles endógenos de glutamato.

Se sabe que el 3-NP *in vitro* altera la homeostasis del calcio involucrando la excitotoxicidad, y a su vez, la muerte por excitotoxicidad ha sido vinculada con la generación de radicales libres (Lafon-Cazal et al., 1993; Alexi et al., 1998). Adicionalmente se ha reportado el papel del estrés oxidativo en el daño neuronal inducido por el 3-NP (La Fontaine, 2000; Teunissen, 2002). La administración sistémica del 3-NP disminuye los niveles de glutatión e incrementa la producción de radicales libres y de nitrotirosina, así como los niveles de proteínas oxidadas en el estriado. Antioxidantes endógenos y exógenos como la coenzima Q10, la N-acetilcisteína, la melatonina, la deshidroepiandrosterona, entre otros, protegen del daño neuronal inducido por el ácido 3-NP (La-fontaine et al., 2000; Nam et al., 2005; Túnez et al., 2004a; Túnez et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo puede ser un importante mediador en la producción del daño neuronal inducido por el 3-NP. Interesantemente, la S-alilcisteína (SAC), el compuesto organosulfurado más abundante del ajo (Lawson 1996), tiene propiedades antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro*, en dicho modelo.

#### **11.2.4.3 Modelos transgénicos**

El desarrollo de modelos de animales transgénicos ha provisto de nuevas pautas en los posibles mecanismos de la patogénesis de la EH. Entre los diferentes modelos, los ratones transgénicos R6/1 y R6/2 son los mejor caracterizados; ambos expresan el exón 1 del gen de la huntingtina en humanos con alrededor de 115 a 150 repeticiones de CAG respectivamente (Mangiarini et al., 1996). Los ratones R6 sólo expresan el exón 1 (de un total de 67 exones de todo el gen) codificando para sólo el 3 % de la región N-terminal de la proteína, lo cual incluye el tracto de poliglutamina (Mangiarini et al., 1996; Smith et al., 2005). Estos ratones presentan algunos síntomas de la EH, incluyendo la disfunción motora, la pérdida de masa muscular y algunos cambios neuropatológicos, tales como la formación de agregados en la corteza y en el neostriado (Petersen et al., 2005; Smith et al., 2005).

Por otra parte, por medio de un estudio de microdiálisis se determinó que los R6/1 muestran cambios en la liberación de neurotransmisores (Niciocaill et al., 2001). En contraste a la EH, en los R6, los niveles de dopamina y de serotonina se ven reducidos (Reynolds et al., 1999; Ariano et al., 2002; Yohrling et al., 2002), y los niveles de proteínas sinápticas son alterados (Lievens et al., 2002; Morton et al.; 2001a, 2001b; Modregger et al., 2002). El sistema de transporte glial que normalmente remueve al glutamato liberado se ve también reducido (Lievens et al., 2001).

Se ha reportado que las células estriatales de los ratones R6 sufren estrés celular debido a que hay un incremento en los marcadores de daño oxidativo al ADN por el incremento en la actividad de la superóxido dismutasa en los R6/1 y la reducción de la función mitocondrial en los R6/2 (Bogdanov, 2001; Tabrizi et al., 2000; Santamaría et al., 2001b); adicionalmente, hay evidencia del incremento en la actividad de la sintasa de óxido nítrico (Pérez-Severiano et al., 2002).

Recientemente, Guidetti y colaboradores han implicado la vía de la kinurenina, tanto en los ratones R6/2 como en ratones YAC128, Hdh<sup>Q92</sup> y Hdh<sup>Q111</sup> (éstos últimos expresan la mutante de htt con 92 y 111 glutaminas, respectivamente). En dicho trabajo se determinaron los niveles de dos metabolitos tóxicos de la vía de la kinurenina, la 3-hidroxicinurenina (3-HK) y el ácido quinolínico (QUIN), los cuales incrementaron principalmente en corteza y estriado en los modelos antes mencionados, y lo único que se diferenciaba entre éstos era el tiempo en el que se detectaban los niveles de toxinas: los R6/2 fueron aquellos que mostraron diferencias desde las primeras semanas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el QUIN puede jugar un papel activo en la neurodegeneración estriatal y cortical de la EH.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Abu-Soud H, Gachhui R, Raushel F, Stuehr D. 1997. The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. *J Biol Chem* 272: 349-353.
- Aikens J, Dix TA. 1991. Peroxy radical (HOO •) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266:15091-15098.
- Alexi T, Hughes PE, Faull RL, Williams CE. 1998. 3-Nitrotopionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *NeuroReport* 9: 57-64.
- Aleyasin H, Cregan SO, Iyirhiaro G, O'Hare MJ, Callaghan SM, Snack RS. 2004. Nuclear factor- $\kappa$ B modulates the p53 response in neurons exposed to DNA damage. *J Neurosci* 24: 2963-2973.
- Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. 2004. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phospho-fructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 6: 45-51.
- Andersen JK. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15(4):961-73.
- Ariano MA, Aronin N, Difiglia M, Tagle DA, Sibley DR, Leavitt BR, et al. 2002. Striatal neurochemical changes in transgenic models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 68: 716-729.
- Aykac-Toker G, Bulgurcuoglu S, Kocak-Toker N. 2001. Effect of peroxynitrite on glutaredoxin. *Hum Exp Toxicol* 20: 373-376.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 77:658-666.
- Baratté S, Molinari A, Veneroni O, Speciale C, Bennatti L, Salvati P. 1998. Temporal and spatial changes of quinolinic acid immunoreactivity in the gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia. *Mol Brain Res* 59: 50.
- Bayer TA, Buslei R, Havas L, Falkai P. 1999. Evidence for activation of microglia in patients with psychiatric illnesses. *Neurosci Lett* 271: 126.
- Beal MF, Matson WR, Swartz KJ, Gamache PH, Bird ED. 1990. Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J Neurochem* 55(4):1327-39.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Schwartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168-171.
- Beal MF. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness? *Ann Neurol* 31: 119-130.

- Beal MF. 1994. Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Current Opinion in Neurology* 7: 542-547.
- Beal MF, Ferrante R, Browne S, Mattews R, Kowall N, Brown RH. 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42: 644-654.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364: 584.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth Enzymol* 223:229-240.
- Beckman JS, Estévez AG, Crow JP, Barbeito L. 2001. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci* 24: S15-S20.
- Bell MJ, Kochanek PM, Heyes MP, Wisniewski SR, Sinz EH, Clark RSB, Bling AR, Marion DW, Adelson PD. 1999. Quinolinic acid in the cerebrospinal fluid of children after traumatic injury. *Crit Care Med* 27: 493-497.
- Behan WMH, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. 1999. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J of Pharmacol* 128: 1754-1760.
- Belle NA, Dalmolin GD, Fonini G, Rubin MA, Rocha JB. 2004. Polyamines reduce lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res* 1008: 245-51.
- Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2):474-82.
- Bjorklund H, Olson L, Dahl D, Schwarcz R. 1986. Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res* 371: 267-277.
- Blight AR, Cohen TI, Saito K, Heyes MP. 1995. Quinolinic acid accumulation and functional deficits following experimental spinal cord injury. *Brain* 118: 735-752.
- Bonfoco E, Krainc C, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7162-7166.
- 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.
- Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF. 2001. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 79:1246-1249.

- Bonini MG, Radi R, Ferrer-Sueta G, Ferriera AM, Augusto O. 1999. Direct EPR detection of carbonate radical anion produced from peroxyxynitrite and carbon dioxide. *J Biol Chem* 274:10802-10806.
- Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecinska M. 1997. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69: 1629-1693.
- Bolaños JP, Peuchen S, Heales SJR, Land JM, Clark JB. 1994. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem* 63: 910-916.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Bredt DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2):682-5.
- Brennan WA, Bird ED, Aprille JR. 1985. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem* 44: 1948-1950.
- Brew BJ, Corbeil J, Pemberton L, Evans L, Saito K, Penny R, Cooper DA, Heyes MP. 1995. Quinolinic acid production is related to macrophage tropic isolates of HIV-1. *J Neurovirol* 1: 369.
- Brose N, Gasic GP, Vetter DE, Sullivan JM, Heinemann SF. 1993. Membrane fusion takes excitatory turn: syntaxin, vesicle docking protein, or glutamate receptor? *Cell* 75(6):1043-4.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59: 427-468.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 28:327-359.
- Cao Y, Gu ZL, Lin F, Han R, Qin ZH. 2005. Caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CHO attenuates quinolinic acid-induced increases in p53 and apoptosis in rat striatum. *Acta Pharmacol Sin* 26: 150-154.
- Cammer W. 2001. Oligodendrocyte killing by quinolinic acid in vitro. *Brain Res* 896: 157.
- Carpenedo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M, Moroni F. 2001. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci* 13(11):2141-7.
- de Carvalho LP, Bochet P, Rossier J. 1996. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem Int* 28(4):445-52.
- Chao CC, Hu S, Peterson PK. 1996. Glia: the not so innocent bystanders. *J Neurovirol* 2: 234-239.
- Chiarugi A, Sbarba D, Paccagnini A, Donnini S, Filippi S, Moroni F. 2000. Combined inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and nitric oxide synthase modulates neurotoxin release by interferon-gamma-activated macrophages. *J Leukocyte Biol* 68: 260.
- Chiarugi A, Meli E, Moroni F. 2001. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *J Neurochem* 77: 1310-1318.

- Chirino YI, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 4(1):20.
- Choe M, Jackson C, Yu BP. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med* 18:977-984.
- Choi DW. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7(2):369-79.
- Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-34.
- Choi JH, YU BP. 1995. Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med* 18:133-139.
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7631-7636.
- Coles CJ, Edmondson DE, Singer TP. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *Journal Biological Chemistry* 254: 5161-5167.
- Conti F, Minelli A, DeBiasi S, Melone M. 1997. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol* 14: 1-18.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Croitoru-Lamoury J, Guillemin GJ, Dormont D, et al. 2003. Quinolinic acid up-regulates chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes. *Adv Exp Med Biol* 527:37-45.
- Crow JP. 1999. Measurement and significance of free and protein-bound 3-nitrotyrosine, 3-chlorotyrosine, and free 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid in biologic samples: a high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection. *Methods Enzymol* 301:151-60.
- Crow JP. 2000. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radic Biol Med* 28:1487-1494.
- Curzon G. 1996. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. *Adv Exp Med Biol* 398: 27-34.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salman A, Szabo C. 1998. Effect of L-buthionine-(S, R)Sulphoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite and endotoxic shock-induced vascular failure. *Br J Pharmacol* 123: 525-537.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Constantino G, Caputi AP. 1999. Beneficial effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-pleurisy. *Free Radic Biol Med* 26: 26-333.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. 2006. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 73-81.

- Day BJ, Shawen S, Liochev SI, Crapo JD. 1995. A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury, in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1227-1232.
- Day BJ, Fridovich I, Crapo JD. 1997. Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. *Arch Biochem Biophys* 347: 256-262.
- Day BJ, Batinic-Haberle J, Crapo JD. 1999. Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 26: 730-736.
- Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. 1996. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 333:49-58.
- DiFiglia M. 1990. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13, 286-289.
- Dihné M, Block F, Korr H, Töpper R. 2001. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res* 902: 178-189.
- Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy JP. 1981. A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res* 226(1-2):107-18.
- Dohi K, Ohtaki H, Inn R, Ikeda Y, Shioda HS, Aruga T. 2003. Peroxynitrite and caspase-3 expression after ischemia/reperfusion in mouse cardiac arrest model. *Acta Neurochir Suppl* 86:87-91.
- 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.
- Ei-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.
- Eastman CL, Guiliarte TR. 1989. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. *Brain Research* 495: 225-231.
- Eastman CL, Guiliarte TR. 1990. The role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. *Neurochem Res* 15: 1101-1107.
- Espey MG, Chernyshev ON, Reinhard JF Jr, Namboodiri MA, Colton CA. 1997. Activated human microglia produce the excitotoxin quinolinic acid. *Neuroreport* 8(2):431-4.
- Favaron M, Manev H, Siman R, Bertolino M, Szekely AM, DeErasquin G, Guidotti A, Costa E. 1990. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5):1983-7.
- Feldblum S, Rougier A, Loiseau H, Loiseau P, Cohadon F, Morselli PL, Lloyd KG. 1988. Quinolinic-phosphoribosyl transferase activity is decreased in epileptic human brain tissue. *Epilepsia* 29: 523-529.

- Felley-Bosco E, Ambs S, Lowenstein CI, Keefer LK, Harris CC. 1994. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in human bronchial epithelial cells induces c-fos and stimulates the cGMP pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 159-164.
- Forster AC, Whersell Jr. WO, Bird ED, Schwarcz R. 1985. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in human and rat brain: activity in Huntington's disease and quinolinate-lesioned rat striatum. *Brain Res* 336: 207-214.
- Foster AC, Collins JF, Schwarcz R. 1983. On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology* 22:1331-1342.
- Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett* 48(3):273-8.
- Frei B, Stocker R, England L, Ames B. 1990. Ascorbate: the most effective oxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264:155-163.
- Gardner PR, Nguyen DD, White CW. 1996. Superoxide scavenging by Mn(II/III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 325: 20-28.
- Gerfen CR. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15, 133-139.
- Goda K, Kishimoto H, Shimizu S, Hamane Y, Ueda M. 1996. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active oxygens during cell death in the brain. *Adv Exp Med Biol* 398:247-254.
- Goldstein S, Cazapski G. 1998. Formation of peroxyxynitrate from the reaction of peroxyxynitrite with CO<sub>2</sub>: Evidence for carbonate radical production. *J Am Chem Soc* 120:3458-3463.
- Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT Jr, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 2000. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry* 39(24):7266-75.
- Gramsbergen JBP, Schmidt W, Turski WA, Schwarcz R. 1992. Age related changes in kynurenic acid production in rat brain. *Brain Res* 588: 1-5.
- Gramsbergen JB, Hodgkins PS, Rassoulpour A, Turski WA, Guidetti P, Schwarcz R. 1997. Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. *J Neurochem.* 69(1):290-8.
- Graybiel AM. 2000. The basal ganglia. *Curr Biol* 10, R509-R511.
- Greenacre SA, Ischiropoulos H. 2001. Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34:541-581.
- Green D, Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends Cell Biol* 8(7):267-71.

- Griffith OW, Stuehr DJ. 1995. Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-736.
- Grilli M, Memo M. 1999. Possible role of NF- $\kappa$ B and p53 in the glutamate-induced pro-apoptotic neuronal pathway. *Cell Death Differ* 6: 22-27.
- Guidetti P, Schwarcz R. 1999. 3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but no NMDA toxicity in the striatum. *Eur J Neurosci* 11: 3857-3863.
- Guidetti P, Reddy PH, Tagle DA, Schwarcz R. 2000. Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model. *Neurosci Lett* 283: 233-235.
- Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 17: 455-461.
- Guidetti P, Bates GP, Graham RK, Hayden MR, Leavitt BR, MacDonald ME, Slow EJ, Wheeler VC, Woodman B, Schwarcz R. 2006. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiology Disease*.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati Pj, Croitoru J, Brew BJ. 2001. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78: 842-853.
- Guillemin GJ, Smythe GA, Veas LA, Takikawa O, Brew BJ. 2003. A beta 1-42 induces production of quinolinic acid by human macrophages and microglia. *Neuroreport* 14: 2311-2315.
- Guillemin GJ, Croitoru-Lamoury J, Dormont D, Armati PJ, Brew BJ. 2003. Quinolinic acid upregulates chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes. *Glia* 41: 371.
- Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. 2005. Indolamine 2,3-dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 395-404.
- Guillemin GJ, Wang L, Brew BJ. 2005. Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex. *J Neuroinflammation* 2: 1-6.
- Gutteridge JM, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.
- Ha HC, Snyder SH. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 13978-13982.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.
- Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic Res* 31:261-272.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 2001. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. USA. pp. 36-104.

- 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. 1992. The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 89, 365-376.
- Harris CM, Massey V. 1992. The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem* 13:8370-8379.
- Hausladen A, Fridovich I. 1994. Superoxide and peroxyxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269(47):29405-8.
- Heyes MP, Rubinow D, Lane C, Markey SP. 1989. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* 26: 275-277.
- Heyes MP, Lackner A. 1990. Increased cerebrospinal fluid quinolinic acid, kynurenic acid and L-kynurenine in acute septicemia. *J Neurochem* 55: 338-341.
- Heyes MP, Nowak TS Jr. 1990. Delayed increases in regional brain quinolinic acid follow transient ischemia in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 660-667.
- Heyes MP, Brew BJ, Martin A, Price RW, Salazar AM, Sidtis JJ, Yergey JA, Mouradian MM, Sadler AE, Keilp J, Rubinow D, Markey SP. 1991. Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurologic status. *Ann Neurol* 29: 202-209.
- Heyes MP, Brew BJ, Saito K, Quearry BJ, Price RW, Lee K, Bhalla RB, Der M, Markey SP. 1992. Inter-relationships between neuroactive kynurenines, neopterin and Beta2 microglobulin in CSF and serum of HIV-1 infected patients. *J Neuroimmunol* 40: 71-80.
- Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A, Larsen SA, Lee K, Leonard HL, Markey SP, Martin A, Milstein S, Mouradian MM, Pranzatelli MR, Quearry BJ, Salazar A, Smith M, Straus SE, Sunderland T, Swedo SE, Tourtellotte WW. 1992. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 115 ( Pt 5):1249-73.
- Heyes MP. 1993. Metabolism and neuropathologic significance of quinolinic acid and kynurenic acid. *Biochem Soc Trans.* 1993 Feb;21(1):83-9.
- Heyes MP, Saito K, Milstein S, Schiff SJ. 1995. Quinolinic acid in tumors, hemorrhage and bacterial infections of the CNS in children. *J Neurol Sci* 133: 112-118.
- Heyes MP, Achim CL, Wiley CA, Major EO, Saito K, Markey SP. 1996. *Biochem J* 320: 595.
- Heyes MP, Saito K, Lackner A, Wiley CA, Achim CL, Markey SP. 1998. Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1 infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J* 12: 881-896.
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci.* 21(19):7463-73.
- Hirata F, Hayaishi O. 1971. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 246(24):7825-6.

- Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18:27-79.
- Hunt A, Patel AJ. 1990. *Neurosci Lett* 115: 318.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S. 1993. Molecular characterization of the family or the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 269: 2836-2843.
- Ignatowicz E, Vezzani AM, Rizzi M, D'Incalci M. 1991. Nerve cell death induced in vivo by kainic acid and quinolinic acid does not involve apoptosis. *Neuroreport* 2: 651-654.
- 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.
- Ischiropoulos H, Zhu LC, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. 1992. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298: 431-437.
- Iwahashi H, Kawamori H, Fukushima K. 1999. Quinolinic acid,  $\alpha$ -picolinic acid, fusaric acid, and 2,6-pyridinedicarboxylic acid enhance the Fenton reaction in phosphate buffer. *Chem Biol Interact* 118: 201-215.
- Jacquard C, Trioulier Y, Cosker F, Escartin C, Bizat N, Hantraye P, Cancela JM, Bonvento G, Brouillet E. 2006. Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca<sup>2+</sup>] rise and neurodegeneration but not Ca<sup>2+</sup> entry during NMDA receptor activation. *FASEB J* 20(7):1021-3.
- Jorgensen M, Tygesen CK, Andersen PH. 1995. Ionotropic glutamate receptors--focus on non-NMDA receptors. *Pharmacol Toxicol* 76(5):312-9.
- Kalosch BE, Jhamandas K, Beninger RJ, Boegman RJ. 1999. Modulation of quinolinic acid-induced depletion of striatal NADPH diaphorase and enkephalinergic neurons by inhibition of nitric oxide synthase. *Brain Res* 817: 151-162.
- Kehrer JP. 2000. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62:235-6.
- Kerr SJ, Armati PJ, Brew BJ. 1995. Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures. *J Neurovirol* 1: 375-380.
- Kerr SJ, Armati PJ, Guillemin GJ, Brew BJ. 1998. Chronic exposure of human neurons to quinolinic acid results in neuronal changes consistent with AIDS dementia complex. *AIDS* 12(4):355-63.
- Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. 1989. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 52(4):1319-28.

- Kew JN, Kemp JA. 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179(1):4-29
- Kohler C, Okuno E, Flood PR, Schwarcz R. 1987. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase: preferential glial localization in the rat brain visualized by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10):3491-5.
- Kohler C, Eriksson LG, Okuno E, Schwarcz R. 1988. Localization of quinolinic acid metabolizing enzymes in the rat brain. Immunohistochemical studies using antibodies to 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Neuroscience* 27(1):49-76.
- Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, Dietrich WD, Magiera CJ, Ellis EF. 1980. Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G<sub>2</sub>. *Science* 209(4462):1242-5.
- Kretz-Remy C, Arrigo AP. 2001. Selenium: a key element that controls NF-kappa B activation and I kappa B alpha half life. *Biofactors* 4: 117-125.
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, et al. 1992. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358(6381):36-41.
- La-Fontaine M, Geddes JW, Banks A, Butterfield DA. 2000. 3-Nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Research* 858: 356-362.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537.
- Lapin IP. 1978. Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol Res Commun* 10(1):81-4.
- Lapin IP, Mirzaev SM, Ryzov IV, Oxenkrug GF. 1998. Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylenetetrazole in mice. *J Pineal Res* 24(4):215-8.
- Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G. 1991. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7233-7237.
- Lees GJ. 1993. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci* 114(2):119-22.
- Lievens JC, Woodman B, Mahal A, Bates GP. 2002. Abnormal phosphorylation of synapsin I predicts a neuronal transmission impairment in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 20:638-648.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.
- Lipton SA. 1998. Neuronal injury associated with HIV-1: approaches to treatment. *Ann Rev Pharmacol* 38: 159-177.

- Lawson LD. 1966. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. in: H.P. Koch, L.D. Lawson (Eds.), *The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 37-107.
- Ludolph AC, He FS, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 1991. 3-Nitropropionic acid exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18: 492-498.
- Lynch MA, Bliss TV. 1986. Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus of the rat; effect of calmodulin and oleoyl-acetyl-glycerol on release of [3H]glutamate. *Neurosci Lett* 65(2):171-6.
- MacDonald V, Halliday G. 2002. Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 10, 378-386.
- Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. 2006. *Eur J Neurol* 13: 30-42.
- Mackensen GB, Patel M, Sheng H, Calvi CL, Batinic-Haberle I, Day BJ, Liang LP, Fridovich I, Crapo JD, Pearlstein RD, Warner DS. 2001. Neuroprotection from delayed postischemic administration of a metalloporphyrin catalytic antioxidant. *J Neurosci* 21(13):4582-92.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37(6):1613-22.
- Makropoulos V, Bruning T, Schulze-Osthoff K. 1996. Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity. *Arch Toxicol* 70: 277-83.
- Maksimovic ID, Jovanovic MD, Colic M, Mihajlovic R, Micic D, Selakovic V, Ninkovic M, Malicevic Z, Rusic-Stojiljkovic M, Jovococ A. 2001. Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. *Vojnosanit Pregl* 58: 237-242.
- Manev H, Costa E, Wroblewski JT, Guidotti A. 1990. Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity. *FASEB J* 4: 2789-2797.
- Mangiarini L, Sathassivam K, Seller M, Cozens B, Harper A., Hetherington C, et al. 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87: 493-506.
- Martin A, Heyes MP, Salazar AM, Kampen DL, Williams J, Law WA, Coats ME, Markey SP. 1992. Progressive slowing of reaction time and increasing cerebrospinal fluid concentrations of quinolinic acid in VIH infected individuals. *J Neuropsychiat Clin Neurosci* 4: 270-279.
- Martin JB, Gusella JF. 1986. Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N Engl J Med* 315, 1267-1276.
- Massieu L, Moran J, Christen Y. 2004. Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Res* 1002(1-2):76-85.

- Matsuda H, Kimura S, Iyanagi T. 2000. One-electron reduction of quinones by the neuronal nitric-oxide synthase reductase domain. *Biochim Biophys Acta* 14:106-116.
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11: 3215-3224.
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 273:23039-23045.
- Mayer ML, Westbrook GL. 1987. Cellular mechanism underlying excitotoxicity. *Trends Neurosci* 10: 59-61.
- McGeer EG, Singh E. 1984. Neurotoxic effects of endogenous materials: quinolinic acid, L-pyroglutamic acid, and thyroid releasing hormone (TRH). *Exp Neurol* 86(2):410-3.
- Michaels RL, Rothman SM. 1990. Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* 10(1):283-92.
- Miller CL, Llenos IC, Dulay JR, Barilo MM, Yolken H, Weis S. 2004. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia *Neurobiol Dis* 15: 618.
- Misko TP, Highkin MK, Veenhuizen AW, Manning PT, Stern MK, Currie MG, Salvemini D. 1998. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem* 273: 15646-15653.
- Misztal M, Skangiel-Kramaska J, Niewiadomska G, Danysz W. 1996. Subchronic intraventricular infusion of quinolinic acid produces working memory impairment-a model of progressive excitotoxicity. *Neuropharmacology*, 35.
- Modregger J, SiProspero NA, Chaeles V, Tagle DA, Plomann M. 2002. PASQUÍN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* 11: 2547-2558.
- Moffett JR, Espey MG, Gaudet SJ, Namboodiri MA. 1993. Antibodies to quinolinic acid reveal localization in select immune cells rather than neurons or astroglia. *Brain Res* 623: 337.
- Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Rad Biol Med* 39: 1291-1304.
- Moroni L, Russi P, Carla V, Lombardi G. 1988. Kynurenic acid is present in the rat brain and its content increases during development and aging processes. *Neurosci Lett* 94: 145-150.
- Morrison PF, Morishige GM, Beagles KE, Heyes MP. 1999. Quinolinic acid is extruded from the brain by a probenecid-sensitive carrier system: a quantitative analysis. *J Neurochem* 72: 2135.
- Morton AJ, Edwardson JM. 2001a. Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 76: 166-172.
- Morton AJ, Faull RL, Edwardson JM. 2001b. Abnormalities in the synaptic vesicle fusion machinery in Huntington's disease. *Brain Res Bull* 56: 111-117.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.

- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
- Murakami K, Ueda T, Morikawa R, Ito M, Haneda M, Yoshino M. 1998. Antioxidant effect of dipicolinic acid on the metal catalyzed lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biomed Res* 19: 205-208.
- Nakagami Y, Saito H, Katsuki H. 1996. 3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum in vivo. *Jpn J Pharmacol* 71: 183-186.
- Nakai M, Qin ZH, Chen JF, Wang Y, Chase TN. 1999. Kainic acid-induced apoptosis is associated with NF- $\kappa$ B activation. *J Neurochem* 74: 647-658.
- Nakai M, Qin ZH, Wang Y, Chase TN. 1999. Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NF-kappaB activation and apoptosis in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 64: 59-68.
- Nakai M, Qin ZH, Wang Y, Chase TN. 2000. NMDA and non-NMDA receptor-stimulated I $\kappa$ -B $\alpha$  degradation: differential effects of the caspase-3 inhibitor DEVD-CHO, free radical scavenger OPC-14117 and ethanol. *Brain Res* 859: 207-216.
- Nakamura TA, Yamada K, Hasegawa T, Nabeshima T. 1995. Possible involvement of nitric oxide in quinolinic acid-induced convulsion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 309-12.
- Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597.
- Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P. 1996. Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience* 73: 185-200.
- Nam E, Min LS, Eun KS, Seok JW, Maeng S, In IH. 2005. Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Research* 1046: 90-96.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Nathan C, Xie Q. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-13728.
- Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. 1990. The role of Ca<sup>2+</sup> in cell killing. *Chem Res Toxicol* 3: 484-494.
- Nicnocaill B, Haraldsson B, Hansson O, O'Connor WT, Brundin P. 2001. Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice. *Eur J Neurosci* 13: 206-210.
- Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato E. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 53:2015-2055.
- 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.

- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-Methyl-d-Aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451: 205-212.
- Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. 1994. Intrahippocampal administration of a glycine site antagonist impairs working memory performance of rats. *Eur J Pharmacol* 253: 183-187.
- Okamoto H, Yamamoto S, Nozaki M, Hayaishi O. 1967. On the submitochondrial localization of I-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 8;26(3):309-14.
- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 1996. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12553-12558.
- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 1998. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem* 70: 299-307.
- Okuno E, Kohler C, Schwarcz R. 1987. Rat 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase: purification from the liver and immunocytochemical localization in the brain. *J Neurochem.* 49(3):771-80.
- Okuno E, Kido R. Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol.* 1991;294:167-76.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P. Mechanisms of calcium-related cell death. In *Advances in Neurology* V71: Cellular and Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage. Eds. Siesjö BK, Wieloch T. pp. 137-151, Lippincott-Raven Publishers 1996.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. 1996. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75:617-636.
- Paxinos G, Watson G. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.
- Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio ME. 2001. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem* 216(1-2):9-19.
- Pemberton LA, Kerr SJ, Smythe G, et al. 1997. Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-gamma, TNF-alpha, and IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 17(10):589-95.
- Pérez-De la Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Cheverri J, Santamaría J. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 135(2): 463-474.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Rios C. 1998. Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* 23: 1297-1302.

- Pérez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Rios C, Segovia J. 2002. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in strata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res* 951: 36-42.
- Perkins MN, Stone TW. 1982. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Research* 247: 184-187.
- Persichetti F., Ambrose C. M., Ge P., McNeil S. M., Srinidhi J., Anderson M. A., Jenkins B., Barnes G. T., Duyao M. P., Kanaley L., and . 1995. Normal and expanded Huntington's disease gene alleles produce distinguishable proteins due to translation across the CAG repeat. *Mol Med* 1, 374-383.
- Person SJ, Reynolds GP. 1991. Determination of 3-hydroxykynurenine in human brain and plasma by HPLC with electrochemical detection: increased concentrations in hepatic encephalopathy. *J Chromatogr* 565: 436-440.
- Person SJ, Reynolds GP. 1992. Increased brain concentration of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 144: 199-201.
- Petersen A, Puschban Z, Lotherius J, NicNiocail B, Wiekop P, O'Connor WT et al. 2002. Evidence for dysfunction of the nigrostriatal pathway in the R6/1 line of transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* 11: 134-146.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. 1994a. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J Comp Neurol* 349(1):85-110.
- Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ. 1994b. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* 14(2):667-96.
- Peunova N, Enikolopov G. 1993. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364: 450-453.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20: 171-181.
- Pittaluga A, Pattarini R, Raiteri M. 1995. Putative cognition enhancers reverse kynurenic acid antagonism at hippocampal NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 272: 203-209.
- Pittaluga A, Vaccari D, Raiteri M. 1997. The 'kynurenate test', a biochemical assay for putative cognition enhancers. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 82-90.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schöper F, Boveris A. 1996. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328: 85-92.

- Poeggeler B, Rassoulpour A, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R. 1998. Dopaminergic control of kynurenate levels and N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing rat striatum. *Dev Neurosci* 20(2-3):146-53.
- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. 1995. Evidence for apoptotic cell death in Huntington's disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15: 3775-3787.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378: 88-104.
- Powers SK, Lennon SL. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58:10025-1033.
- Prado de Carvalho L, Bochet P, Rossier J. 1996. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem Int* 28: 445.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296:295-309.
- Qin ZH, Chen RW, Wang Y, Nakai M, Chuang DM, Chase TN. 1999. NF- $\kappa$ B nuclear translocation up-regulates c-Myc and p53 during N-methyl-D-aspartate receptor-mediated apoptosis. *J Neurosci* 19: 4023-4033.
- Qin ZH, Wang Y, Chase TN. 2000. A caspase-3-like protease is involved in NF- $\kappa$ B activation induced by stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum. *Mol Brain Res* 80: 111-122.
- Rachek LI, Musiyenko SI, Ledoux SP, Wilson GL. 2006. Palmitate induced mtDNA damage and apoptosis in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* (In press).
- [Radewicz K, Garey LJ, Reynolds R. 1998. \*Schizophr Res\* 29: 86.](#)
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266(7):4244-50.
- Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30(5):463-88.
- Rami A, Fergar D, Krieglstein J. 1997. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res* 27: 93-97.
- 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, 5733-5737.
- Reinhard Jr JF. 1998. Altered tryptophan metabolism in mice with herpes simplex virus encephalitis: increases in spinal cord quinolinic acid. *Neurochem Res* 23: 661-665.

- Reynolds GP, Dalton CF, Tillery CL, Mangiarini L, Davies SW, Bates GP. 1999. Brain neurotransmitter deficits in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *J Neurochem* 72: 1773-1776.
- Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110.
- Richfield EK, Maguire-Zeiss KA, Vonkeman HE, Voorn P. 1995. Preferential loss of preproenkephalin versus preprotachykinin neurons from the striatum of Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 38, 852-861.
- Rios C, Santamaría A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neuroch Res* 16: 1139-1143.
- Roberts RC, Du F, McCarthy KE, Okuno E, Schwarcz R. Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 1992 Dec 1;326(1):82-90.
- Roberts RC, McCarthy KE, Du F, Okuno E, Schwarcz R. 1995. 3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate containing axon terminals in the rat striatum. *J Neurosci* 15: 1150-1161.
- Rodriguez-Martinez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J, Santamaria D, Galvan-Arzate S, Santamaria A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436-439.
- Roitberg BZ, Emborg ME, Sramek JG, Palfi S, Kordower JH. 2002. Behavioral and morphological comparison of two non-human primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery* 51: 852-853.
- Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H. 1995. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8: 473-477.
- Ross CA. 2002. Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35, 819-822.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
- Rossato JI, Ketzer LA, Centuriao FB, Silva SJ, Ludtke DS, Zeni G, Braga AL, Rubin MA, Rocha JB. 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 27: 297-303.
- Rossato JI, Zeni G, Mello CF, Rubin MA, Rocha JB. 2002. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci Lett* 318: 137-40.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Talleri R, Kalyamanaran B, Barnes S, Kirk M, Kikuchi M, Freeman BA. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269:26066-26075.

- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. 2003. Neuroprotective effects of pyruvate in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 183: 700-704.
- 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.
- Saito K, Crowley JS, Markey SP, Heyes MP. 1993. A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. *J Biol Chem* 268: 15496-15503.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. 1993. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 90: 2628-2632.
- Saito K, Markey SP, Heyes MP. 1994. 6-Chloro-D,L-tryptophan, 4-chloro-3-hydroxyanthranilate and dexamethasone attenuate quinolinic acid accumulation in brain and blood following systemic immune activation. *Neurosci Lett* 178(2):211-5.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, Mishina M. 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373(6510):151-5.
- Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA. 1995. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 215(3):1111-8.
- Salvemini D, Masferrer JL. 1996. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: In vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol* 269: 1225.
- Salvemini D, Wang Z, Stern KM, Currie GM, Misko T. 1998. Peroxynitrite decomposition catalysts: Therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Pharmacology* 95:2659-2663.
- Sanberg PR, Calderon SF, Giordano M, Tew JM, Norman AB. 1989. The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor Abnormalities. *Exp Neurol* 105: 45-53.
- Santamaria A, Rios C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159(1-2):51-4.
- Santamaria A, Rios C, Solis-Hernandez F, Ordaz-Moreno J, Gonzalez-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J. 1996. Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 35(1):23-8.
- Santamaría A, Santamaría D, Diaz-Muñoz M, Espinoza-Gonzalez V, Rios C. 1997. Effects of N-omega-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 93: 117-124.
- Santamaria A, Galvan-Arzate S, Lisy V, Ali SF, Duhart HM, Osorio-Rico L, Rios C, St'astny F. 2001. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *Neuroreport* 12: 871-874.
- Santamaría A, Perez-Severiano F, Rodriguez-Martinez E, Maldonado PD, Pedraza Chaverri J, Rios C, et al. 2001b. Comparative análisis of superoxide dismutase activity between acute pharmacological models and a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochem Res* 26: 419-424.

- Santamaría A, Jimenez-Capdeville ME, Camacho A, Rodriguez E, Flores A, Galvan-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12: 2693-2696.
- Santamaria A, Salvatierra-Sanchez R, Vazquez-Roman B, Santiago-Lopez D, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Jimenez-Capdeville ME, Ali SF. 2003. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 86(2):479-88.
- Santamaria A, Vazquez-Roman B, La Cruz VP, Gonzalez-Cortes C, Trejo-Solis MC, Galvan-Arzate S, Jara-Prado A, Guevara-Fonseca J, Ali SF. 2005. Selenium reduces the proapoptotic signaling associated to NF-kappaB pathway and stimulates glutathione peroxidase activity during excitotoxic damage produced by quinolinate in rat corpus striatum. *Synapse* 58: 258-66.
- Santiago-Lopez D, Vazquez-Roman B, Perez-de La Cruz V, Barrera D, Rembao D, Salinas-Lara C, Pedraza-Chaverri J, Galvan-Arzate S, Ali SF, Santamaria A. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54: 233-238.
- Sardar AM, Bell JE, Reynolds GP. 1995. Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of VIH-1 positive patients. *J Neurochem* 64: 932-935.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186.
- Schaich KH. 1992. Metals and lipid oxidation. *Lipids* 27:209-218.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F. 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 2001: 00-0439fje.
- Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38(10):1431-76.
- Schuck PF, Tonin A, Ferreira GC, Rosa RB, Latini A, Balestro F, Perry MLS, Wannmacher CMD, Wyse AT, Wajner M. 2006. In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. *Neurosci Res* (In press).
- Schwartz PJ, Reaume A, Scott R, Coyle JT. 1998. Effects of over- and under-expression of Cu,Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brain Res* 789: 32-9.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that causes axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO Jr, Kohler C. 1984. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 35(1):19-32.
- Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell Jr WO. 1988. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Proc Natl Acad Sci* 85: 4079-4981.

- Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu HQ, Medoff D, Tamminga CA, Roberts RC. 2001. Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50(7):521-30.
- Schwarcz R, Albin RL. 2002. Huntington's disease. In: Lodge D, Danysz W, Persons CG (Eds), *Ionotropic glutamate receptors as Therapeutic Targets*. FP Graham Publishing Co., Tennessee, pp. 587-610.
- Schwarcz R, Pellicciari R. 2002. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 1-10.
- Sei Y, Fossum L, Goping G, Skolnick P, Basile AS. 1998. Quinolinic acid protects rat cerebellar granule cells from glutamate-induced apoptosis. *Neurosci Lett* 241: 180.
- Shear DA, Dong J, Haik-Oreguer KL, Bazzet TJ, Albin RL, Dunbar GL. 1998. Chronic administration of quinolinic acid in the rat striatum causes spatial learning deficits in a radial arm water maze task. *Exp Neurol* 150: 305-311.
- Shear DA, Dong J, Gundi CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL. 1998. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's Disease. *Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 22: 1217-1240.
- Sheline CT, Behrens MM, Choi DW. 2000. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD<sup>+</sup> and inhibition of glycolysis. *J Neurosci* 20: 3139-3146.
- Shimanovich R, Groves TJ. 2001. Mechanisms of peroxynitrite decomposition catalyzed by FeTMPDS, a bioactive sulfonated iron porphyrin. *Arch Biochem Biophys* 387:307-317.
- Siesjo BK. 1981. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 155-185.
- Simantov R, Blinder E, Ratovitski T, Tauber M, Gabbay M, Porat S. 1996. Dopamine-induced apoptosis in human neuronal cells: inhibition by nucleic acids antisense to the dopamine transporter. *Neuroscience* 74(1):39-50.
- Sinz EH, Kochanek PM, Heyes MP, Wisniewski SR, Bell MJ, Clark RSB, DeKosky ST, Blight AR, Marion MJ. 1998. Quinolinic acid is increased in CFS and associated with mortality after traumatic brain injury in humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 610-615.
- Soneja A, Drews M, Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Reports* 57: 108-119.
- Southgate GS, Daya S, Potgieter D. 1998. Melatonin plays a protective role in quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *J Chem Neuroanat* 14: 151-156.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Smith R, Brundin P, Li JY. 2005. Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci* 62: 1901-1912.

- St'astny F, Hinoi E, Ogita K, Yoneda Y. 1999. Ferrous iron modulates quinolinate-mediated [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to rat brain synaptic membranes in the presence of glycine and spermidine. *Neurosci Lett* 262: 105-8.
- Steele RJ, Stewart MG. 1993. 7-Chlorokynurenate, an antagonist of the glycine binding site on the NMDA receptor, inhibits memory formation in day-old chicks (*Gallus-domesticus*). *Behav Neural Bio* 60: 89-92.
- Stern MK, Jensen MP, Kramer K. 1996. Peroxynitrite decomposition catalysts. *J Am Chem Soc* 118:8735-8736.
- Stípek S, Stastny F, Platenik J, Crkovská J, Zima T. 1997. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem Int* 30: 233-237.
- Stone TW, Perkins MN. 1981. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72: 411-412.
- Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kinurenic acids. *Pharmacol Rev* 45: 309-379.
- Stone TW, Behan WM, MacDonald M, Darlington LG. 2000. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Amino Acids* 9: 275-81.
- Stone TW. 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* 64: 185-218.
- Stone TW. 2001. Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicon* 39: 61-73.
- Stone TW, Darlington LG. 2002. Endogenous kinurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Rev Drug Discovery* 1: 609-620.
- Struys-Ponsar C, Florence A, Gauthier A. 1994. Ultrastructural changes in brain parenchyma during normal aging and in animal models of aging. *J Neural Transm Suppl* 44: 111-132.
- Stuehr DJ. 1997. Structure – function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-359.
- Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA. 2006. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* 22: 76-87.
- Susel Z, Engber TM, Chase TN. 1989. Behavioral evaluation of the anti-excitotoxic properties of MK-801: comparison with neurochemical measurements. *Neurosci Lett* 104: 125-9.
- Susel Z, Engber TM, Kuo S, Chase TN. 1991. Prolonged infusion of quinolinic acid into rat striatum as an excitotoxic model of neurodegenerative disease. *Neurosci Lett* 121: 234-238.
- Szabó C, Salzman AL. 1996. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages, using a novel mesoporphyrin superoxide dismutase analog and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381: 82-86.
- Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag 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.
- Szabo C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 140-141:105-12.
- Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, et al. 2000. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol* 47: 80-86.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Alves LB, Ponciuncula LO, Emanuelli T, Souza DO. 2002. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40: 621-627.
- Tenneti L, Lipton SA. 2000. Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 74: 134-142.
- Thiyagarajan M, Kaul CL, Sharma SS. 2004. Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats. *Br J Pharmacol* 142(5):899-911.
- Thomas SR, Mohr D, Stocker R. 1994. Nitric oxide inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 269: 14457-14464.
- Thompson KA, McArthur JC, Wesselingh SL. 2001. Correlation between neurological progression and astrocyte apoptosis in HIV-associated dementia. *Ann Neurol* 49: 745-752.
- Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol* 244:615-31.
- Triggs WJ, Willmore LJ. 1984. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. *J Neurochem* 42(4):976-80.
- Torrey EF, Yolken RH, Zito M, Heyes M. 1998. *Schizophr Res* 29: 91.
- Túnez I, Montilla P, Muñoz MC, Feijoo M, Salcedo M. 2004. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J Pineal Res* 37: 252-256.
- Túnez I, Muñoz MC, Montilla M. 2005. Treatment with dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes. *Pharmacology* 74: 113-118.
- Tymianski M, Wallace MC, Spigelman I, Uno M, Carlen PL, Tator CH, Charlton MP. 1993. Cell-permeant Ca<sup>2+</sup> chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron*. 1993 Aug;11(2):221-35.
- Vender AD. 1975. The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. In John Wiley and Sons (Eds.), *Aminoacid metabolism*, John Wiley and Sons, USA pp 172-177.
- Vasquez-Vivar J, Hogg N, Martasek P, Karoui H, Pritchard KA, Kalyanaraman B. 1999. Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 274: 26736-26742.
- Vezzani A, Sangalli L, Wu HQ, Schwarcz R. 1987. ATP as a marker of excitotoxin-induced nerve cell death in vivo. *J Neural Transm* 70(3-4):349-56.

- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141:113-24.
- Wada H, Ito H, Orimo H, Sato A. 1994. Kynurenine specifically increases in the cerebrospinal fluid of the aged rats. *Biogenic Amines* 10: 221-225.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416: 535-539.
- Watkins JC, Jane DE. 2006. The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S100-8.
- Werner P, Voigt M, Keinanen K, Wisden W, Seeburg PH. 1991. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351(6329):742-4.
- Whetsell WO Jr., Schwarcz R. 1989. Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neurosci Lett* 97: 271.
- Wolf J. 1974. Studies on tryptophan metabolism in man. *Scand J Clin Lab Invest* 136: 1-186.
- Wood ER, Bussey TJ, Phillips AG. 1993. A glycine antagonist 7-chlorokynurenic acid attenuates ischemia-induced learning deficits. *Neuroreport* 4: 151-154.
- Wu H, Lozano G. 1994. NF- $\kappa$ B activation of p53: a potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* 269: 20067-20074.
- 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(1):142-50.
- Wullner U, Young AB, Penney JB, Beal MF. 1994. 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J Neurochem* 65(5): 1772-1781.
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. 1998. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273:14085-14089.
- Yamamoto H, Shindo I, Egawa B, Horiguchi K. 1994. Kynurenic acid decreased in cerebrospinal fluid of patients with infantile spasms. *Ped Neurol* 10: 9-12.
- Yohrling IG, Jiang GC, DeJohn MM, Robertson DJ, Vrana KE, Cha JH. 2002. Inhibition of tryptophan hydroxylase activity and decreased 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 82: 1416-1423.
- Young SN, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. 1988. NMDA receptor losses in putamen in patients with Huntington's disease. *Science* 241: 981-983.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.

- Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC, Choi DW. 1999. Role of the outward delayed rectifier K<sup>+</sup> current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 73: 933-941.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10:291-316.
- Zentella M, Saldaña Y. 1996. Papel Fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioquímica* 15:152-161.
- Zhang Y, Dawson VL, Snyder SH. 1994. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263: 687-689.
- Zhuang S, Simon G. 2000. Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(2):C341-51.