



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

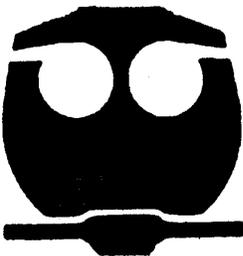
**“Efecto de la L-carnitina sobre las alteraciones  
morfológicas y conductuales producidas por el ácido  
quinolínico en ratas”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**IRMA DANIELA SILVA ADAYA**



**MÉXICO, D.F.**

**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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**Efecto de la L-carnitina sobre las alteraciones morfológicas y  
conductuales producidas por el ácido quinolínico en ratas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**IRMA DANIELA SILVA ADAYA**

**MÉXICO, D.F.**

**2007**

---

Jurado asignado:

Presidente	José Pedraza Chaverri
Vocal	Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
Secretario	Abel Santamaría Del Ángel
1er. Suplente	Sobeida Sánchez Nieto
2º. Suplente	Alejandro Ortiz Osornio

**Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S.

**ASESOR:**

Dr. Abel Santamaría del Angel \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

Irma Daniela Silva Adaya \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

**A dios por haberme dado la vida la facultad y los medios para lograr esta meta.**

**Al Dr. Abel Santamaría Del Ángel , mi tutor, por brindarme su apoyo , sus conocimientos y principalmente su amistad.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado.**

**Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S., y a la Fundación Armstrong por haberme brindado los medios para lograr este trabajo.**

## **DEDICATORIAS**

**Con todo amor, cariño y respeto, a mis padres, Irma y Arnulfo, con los cuales estare eternamente agradecida por todo lo que me han brindado a lo largo de mi vida. Gracias por su apoyo, amor y consejos que siempre me sacaron adelante y me alentaron a esforzarme día con día para lograr mi sueño realidad.**

**A mis hermanos Arnulfo, Juan Carlos, Gerardo y Mauricio, por ser mis grandes amigos y un gran ejemplo a seguir.**

**A mis compañeras y amigas, Nieves y Verónica, por su ayuda y apoyo.**

**A todos mis amigos de la facultad, por todos los momentos felices y tristes que compartimos.**

## INDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
3.1 Anatomía del Sistema nervioso central.....	3
3.2 Enfermedad de Huntington.....	4
3.2.1 Antecedentes.....	4
3.2.2 Patología de EH.....	5
3.2.3 Modelos experimentales de EH.....	6
3.3 Modelo con ácido quinolínico.....	8
3.3.1 Ácido quinolínico.....	8
3.3.2 Neurotoxicidad.....	9
3.3.3 Alteraciones conductuales.....	10
3.3.4 Alteraciones morfológicas.....	11
3.4 Excitotoxicidad.....	12
3.5 Estrés oxidativo.....	12
3.5.1 Especies reactivas del oxígeno.....	13
3.6 Agentes Antioxidantes.....	14
3.7 L-Carnitina.....	15
3.7.1 Propiedades antioxidantes y ..... precursoras del metabolismo energético de la L-carnitina	16
4. HIPOTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	18
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
6.1 Sujetos de experimentación.....	19
6.2 Materiales y reactivos.....	19
6.3 Métodos.....	20
6.3.1 Pretratamiento con L-carnitina ..... e inyección intraestriatal con QUIN.....	20
6.3.2 Medición de conducta de rotación.....	20
6.3.3 Perfusión y obtención de cerebro completo.....	20
6.3.4 Inclusión en parafina.....	21
6.3.5 Inmunohistoquímica contra GFAP.....	21

6.3.6	Tinción de laminillas y contraste de núcleos.....	22
6.3.7	Conteo de células reactivas.....	23
6.4	Análisis estadístico.....	23
6.5	Diagrama de Flujo.....	23
7.	RESULTADOS.....	24
7.1	Efecto de la L-carnitina sobre la conducta ..... de rotación inducida por QUIN	24
7.2	Efecto de la L-carnitina sobre la inmunoreactividad..... contra GFAP inducida por el QUIN en cuerpo estriado	25
8.	DISCUSION.....	27
9.	CONCLUSIONES.....	29
10.	PERSPECTIVAS.....	30
11.	BIBLIOGRAFIA.....	31

## 1. ABREVIATURAS

- ✓ 3-NP    Ácido 3 nitroproiónico
- ✓ AMPA     $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
- ✓ APO    Apomorfina
- ✓ ATP    Adenosin trifosfato
- ✓ CAT    Colina acetiltransferasa
- ✓ CAG    Citosina-adenina-guanina
- ✓ CoA    Coenzima A
- ✓ EH    Enfermedad de Huntington
- ✓ EROS    Especies reactivas de oxígeno
- ✓ GABA    Acido gama-aminobutírico
- ✓ GAD    Glutamato descarboxilasa
- ✓ GFAP    Proteína glial fibrilar acídica
- ✓ Glu    Glutamato
- ✓ GluR    Receptor para glutamato
- ✓ Gpe    Globo pálido
- ✓ Gpx    Glutación peroxidasa
- ✓ Htt    Huntingtina
- ✓ IA    Ácido Iboténico
- ✓ KA    Acido Kaínico
- ✓ L-CAR    L-Carnitina
- ✓ mGluR    Receptor metabotrópico para glutamato
- ✓ MSNs    Neuronas espinosas medianas
- ✓ NaCl    Cloruro de sodio
- ✓ NADPH    Nicotinamida dinucleótido fosfato
- ✓ NAD<sup>+</sup>    Nicotinamida adenin dinucleótido
- ✓ NMDA    N-metil-D-aspartato
- ✓ NMDAr    Receptores para NMDA
- ✓ PBS    Amortiguador de fosfatos
- ✓ QUIN    Acido quinolínico
- ✓ RL    Radicales libres
- ✓ S.S.I    Solución salina isotónica
- ✓ SNC    Sistema nervioso central
- ✓ SOD    Superóxido dismutasa

## **1. RESUMEN**

Antecedentes. El ácido quinolínico (QUIN) es una excitotoxina que reproduce el modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington en ratas. El QUIN es un agonista glutamatérgico del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y causa degeneración en regiones específicas del cerebro; genera sus efectos vía la sobreactivación de receptores NMDA produciendo neurotoxicidad a través de mecanismos de excitotoxicidad y daño oxidativo.

Por su parte la L-carnitina posee propiedades antioxidantes y precursoras del metabolismo energético ampliamente reportadas, por lo que nosotros sugerimos el uso de este compuesto, para disminuir la neurotoxicidad causada por el QUIN.

Objetivo. Evaluar el efecto de la L-Carnitina sobre 2 marcadores de neurotoxicidad (conducta rotatoria y inmunoreactividad contra GFAP), causada por la infusión estriatal de QUIN.

Métodos. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (HsdBrlHan: WIST), las cuales fueron tratadas con L-carnitina (100 mg/kg) 1 hora antes de la infusión intraestriatal con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L), seis días después de la administración de QUIN, fue evaluada la conducta de rotación, inducida por apomorfina (APO) durante una hora, las ratas se perfundieron, para posteriormente extraer el cerebro completo, y realizarle una prueba de inmunoreactividad contra Proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

Resultados. En los animales tratados solo con QUIN, aumentó la conducta de rotación, así como las células inmunoreactivas contra GFAP, comparado con el control; mientras que en los animales pretratados con L- Carnitina disminuyeron estos patrones de neurotoxicidad, así mismo en estos animales se presenta una mayor preservación celular que aquellos tratados solo con QUIN.

Conclusiones. Los resultados anteriores sugieren que la L-Carnitina, disminuye la conducta rotatoria y la inmunoreactividad contra GFAP, debido a sus propiedades antioxidantes y/o energéticas ante el daño neuronal causado por la infusión estriatal de QUIN.

### 3. INTRODUCCION

#### 3.1 Anatomía del Sistema nervioso central

Este sistema esta compuesto por células que pueden ser divididas en 2 categorías amplias: células nerviosas o neuronas y distintas células de sostén. Las primeras están especializadas en el señalamiento eléctrico sin embargo, y las segundas consisten principalmente en las células neurogliales. Es rica diversidad funcional y la capacidad de las células nerviosas para formar los circuitos, de los cuales dependen finalmente la sensibilidad, la percepción y el comportamiento.

Las células de la glía, son muy diferentes a las nerviosas, ya que no participan en el señalamiento eléctrico, aunque algunas de sus funciones de sostén pueden ayudar a mantener las capacidades de señalamiento de las neuronas.

Existen en el SNC tres tipos de células gliales:

-Los astrocitos: los cuales su función principal es mantener, de diferentes maneras, un medio químico apropiado para el señalamiento neuronal.

-Los oligodendrocitos, los cuales son importantes sobre la velocidad de conducción del potencial de acción.

-Las células de la microglia: esta prolifera luego de una lesión del sistema nervioso y ayuda presumiblemente, a reparar el daño neuronal.

Por lo general, se considera que el sistema nervioso central incluye siete partes básicas:

La medula espinal, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencefalo y los hemisferios cerebrales.

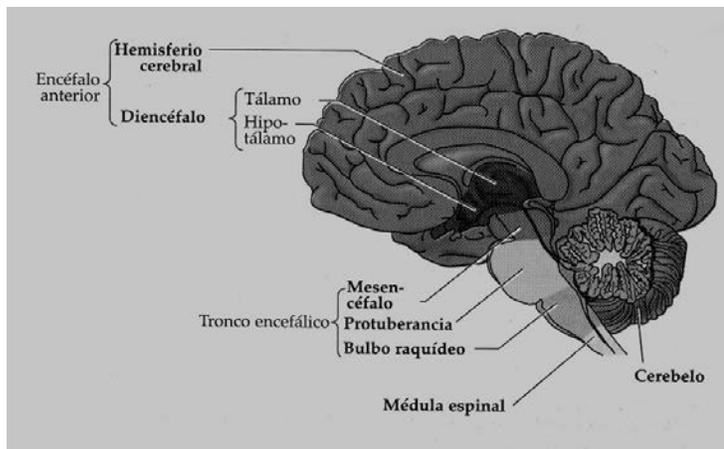


Fig.1 Vista mediosagital del encéfalo adulto que muestra las principales divisiones del SNC.

Toda la superficie plegada de los hemisferios comprende una cáscara laminada de neuronas y células de sostén de unos 2 mm de espesor denominada corteza cerebral

Algunas estructuras clave se ubican más profundamente en los hemisferios. Las más grandes son los ganglios basales. Las neuronas de estos núcleos grandes reciben aferencias de la corteza cerebral y participan en la organización y la guía de las funciones motoras complejas. Los ganglios basales incluyen tres subestructuras principales: el caudado, el putamen y el globo pálido. El caudado y el putamen son muy similares en sus características estructurales y funcionales y se denominan, en conjunto, estriado.

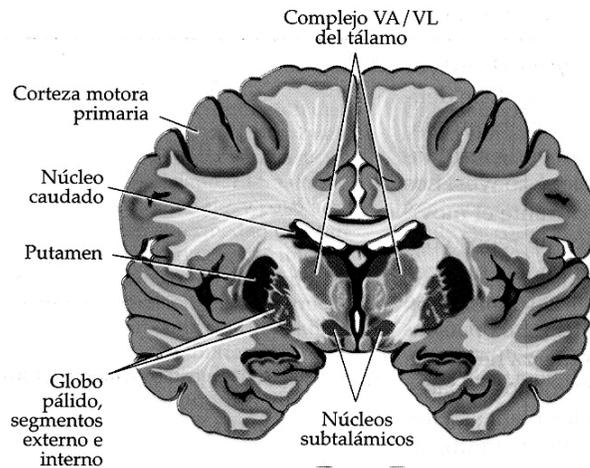


Fig.2 Corte coronal que muestra los componentes de los ganglios basales. También están indicados los núcleos talámicos ventroanterior y ventrolateral (complejo VA/VL). Estos núcleos talámicos son los blancos de los ganglios basales, que transmiten los efectos moduladores de los ganglios basales hacia la corteza

## 3.2 Enfermedad de Huntington

### 3.2.1 Antecedentes

En 1872, George Huntington (1850-1916) hizo la primera descripción clínica completa y clara de una enfermedad familiar, cuyos pacientes había estudiado, junto con su abuelo y a su padre, en Long Island, Nueva York. La Enfermedad de Huntington (EH) afecta a todas las razas, con una incidencia de 4-7/100,000 habitantes en los países occidentales, siendo mucho más baja en individuos de raza negra, orientales y finlandeses (Martínez y Rábano, 2002). Aunque su edad media de manifestación se sitúa alrededor de los 40 años, se puede presentar desde la infancia y hasta la vejez (Martínez y Rábano, 2002).

Se hereda con carácter autosómico dominante debido a una mutación en el gen de la huntingtina (Htt), proteína de función aún desconocida, pero que se sabe que en su forma mutada es responsable de alteraciones en algunos componentes del citoesqueleto, afectando así el transporte axonal y conduciendo a muerte celular. La

mutación consiste en un aumento en el número de tripletes de CAG (Citosina-adenina-guanina) que codifican para una secuencia de poliglutamina en la región N-terminal de la Htt. El gen silvestre para la Htt ubicado en el brazo corto del cromosoma 4 contiene entre 9 y 35 copias de CAG, mientras que en el gen causante de la enfermedad, el número de repeticiones de tripletes es superior a 40; es decir, cuanto mayor es el número de repeticiones de CAG, más temprano se manifiesta la patología, llevando un curso clínico más grave y las alteraciones neuropatológicas son más severas (Martínez y Rábano , 2002).

La EH es un proceso neurodegenerativo en el cual los pacientes experimentan movimientos coreicos involuntarios, así como trastornos de carácter progresivos y demencia. Conforme la enfermedad va progresando, la corea cambia a rigidez, bradicinesia y distonia, aunque el patrón y progresión de la sintomatología puede variar entre pacientes (Alexi et al., 2000). También se presentan cambios en la personalidad acompañados de fallas de memoria y deterioro de las capacidades intelectuales. En un inicio la enfermedad se manifiesta como espasmos musculares leves, falta de coordinación y algunas veces con cambios en la personalidad. A medida que la enfermedad progresa el deterioro intelectual produce alteraciones en el habla y la memoria.

Con el tiempo, la pérdida de células nerviosas en varias regiones del cerebro hace que el paciente con enfermedad de Huntington presente mayor incapacidad y dificultad para valerse por sí mismo. Aun cuando la enfermedad no es mortal, la condición de debilidad del paciente produce complicaciones como neumonía, problemas cardíacos o infecciones que eventualmente llevan a la muerte.

Se cree que en México existen alrededor de 8000 personas con enfermedad de Huntington. Las estadísticas exactas son difíciles de obtener no sólo porque en nuestro país no se cuenta con la infraestructura para llevar a cabo censos en este tipo de enfermedades sino porque la enfermedad es difícil de diagnosticar y muchas personas optan por esconder a sus familiares con EH.

### **3.2.2 Patología de EH**

El marcador fisiopatológico de la EH por excelencia es la atrofia severa del neocórtex, el cual marca una pérdida neuronal considerable, mientras que regiones como la corteza cerebral y el hipotálamo también pueden mostrar pérdida neuronal, pero en menor grado (Kumar, 2004). El proceso de astrocitosis en el córtex es otra

observación distintiva, con pequeñas astrocitosis asociadas a pérdida neuronal fuera del estriado. La atrofia incrementada puede redundar en la visión de un cerebro más pequeño de lo normal (Alexi et al., 2000).

Las alteraciones neuroquímicas en la EH, en particular en el caudado-putamen, incluyen la disminución en los niveles de GABA, sustancia P, encefalina y colina acetiltransferasa, así como un incremento en los niveles de somatostatina, neuropeptido Y, neurotensina y serotonina, mientras que la dopamina se mantiene sin cambios. A nivel morfológico, la EH está caracterizada por una disminución de neuronas que contienen NADPH-diaforasa, parvalbúmina y acetilcolinesterasa (Santamaría y Jiménez, 2005).

Una de las hipótesis de la degeneración en la EH es la “hipótesis excitotóxica”, la cual estipula que la activación excesiva de receptores a glutamato puede provocar incremento de glutamato liberado por aferentes corticales, reducción en la recaptura del mismo transmisor por la glia, e hipersensibilidad de receptores postsinápticos a glutamato en proyecciones neuronales estriatales. Esto cursaría con señalización patológica posterior a la activación a receptores glutamatérgicos producidas por la homeostasis alterada de calcio intracelular y disfunción mitocondrial, que puede dar lugar a la muerte celular de neuronas espinosas estriatales medianas (MSNs) (Fan y Raymond, 2006).

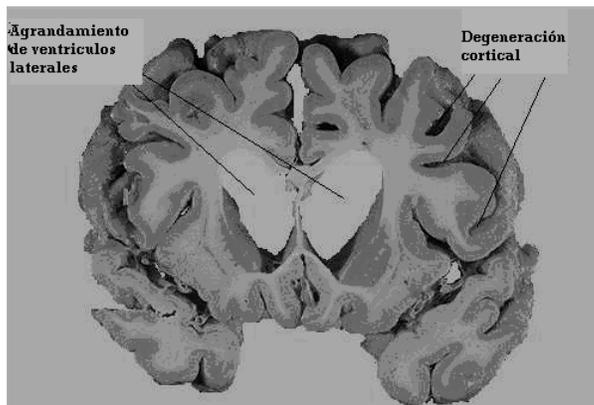


Fig. 3 Corte coronal cerebral mostrando los efectos de EH

### 3.2.3 Modelos experimentales de EH

Se han investigado diferentes modelos animales que semejan algunas características neuroquímicas e histopatológicas de la EH. Los modelos farmacológicos más relevantes de esta enfermedad incluyen inyecciones

intraestriatales (ganglios basales del SNC) y/o sistémicas de análogos del glutamato como son: ácido kaínico (KA), ácido iboténico (IA), ácido quinolínico (QUIN) y ácido 3-nitropropiónico (3-NP) a roedores y primates no humanos. Tanto el KA como el IA producen degeneración de neuronas estriatales y reducción de la glutamato descarboxilasa (GAD) y la colina acetiltransferasa (CAT), aunque estas toxinas no son capaces de reproducir otros factores histopatológicos y neuroquímicos específicos de la EH. En el caso del 3-NP, esta toxina produce atrofia estriatal y mimetiza algunas características histopatológicas y neuroquímicas de la EH. Sin embargo, en contraste con el QUIN, el 3-NP no es una toxina endógena y no reproduce selectivamente varios factores bioquímicos de la EH, como lo hace el QUIN. Una ventaja de esta última toxina como modelo de la EH es su implicación directa como un factor causal potencial de la enfermedad, debido a su naturaleza endógena (Santamaría y Jiménez, 2005)

En la siguiente tabla se presentan, de manera comparativa, algunas de las alteraciones neuroquímicas selectivas del QUIN, de otros modelos experimentales de la EH y de la misma enfermedad.

Neuropatología	HD	KA/IA	QA/NMDA	3-NP/MA
GAD/GABA	↓	↓	↓	↓
CAT	↓ =	↓	↓ =	↓ =
Encefalina	↓	↓	↓	↓
Substancia P	↓	↓	↓	↓
Paralbumina	↓ =	↓	↓	?
Gliosis	↑	↑	↑	↑

Tabla 1. Neuropatología estriatal en cerebros *post mortem* de pacientes humanos (HD) con EH y diferentes modelos animales de la enfermedad (Tomado de Alexi et al., 2000). NMDA = N-metil-D-aspartato; MA = Malonato.

Existe otro modelo de la EH basado en alteraciones moleculares a través de repeticiones del trinucleótido CAG en ratones mutantes. Esta alteración ha permitido la creación de modelos de ratones transgénicos para la EH, entre los cuales, las líneas R6/0, R6/1, R6/2 y R6/5 difieren uno del otro en el número de repeticiones de CAG (Santamaría y Jimenez, 2005). Lamentablemente, aún cuando poseen parte del genoma humano aberrante, estos ratones no han sido capaces de reproducir fielmente las alteraciones neuroquímicas, morfológicas y conductuales de la enfermedad.

### 3.3 Modelo con ácido quinolínico

#### 3.3.1 Ácido quinolínico

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín dicarboxílico o QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptofano producido por enzimas del ciclo de las kinureninas, las cuales son producidas en el cerebro por células gliales en condiciones normales, o por macrófagos bajo condiciones patológicas (inflamación e infección). En tejidos periféricos, la vía está presente en el hígado y el riñón.

El QUIN es un intermediario en la síntesis de co-factores esenciales como el ácido nicotínico y la nicotinamina adenin dinucleótido (NAD<sup>+</sup>). A continuación se presenta una forma esquematizada de la vía de la kinurenina.

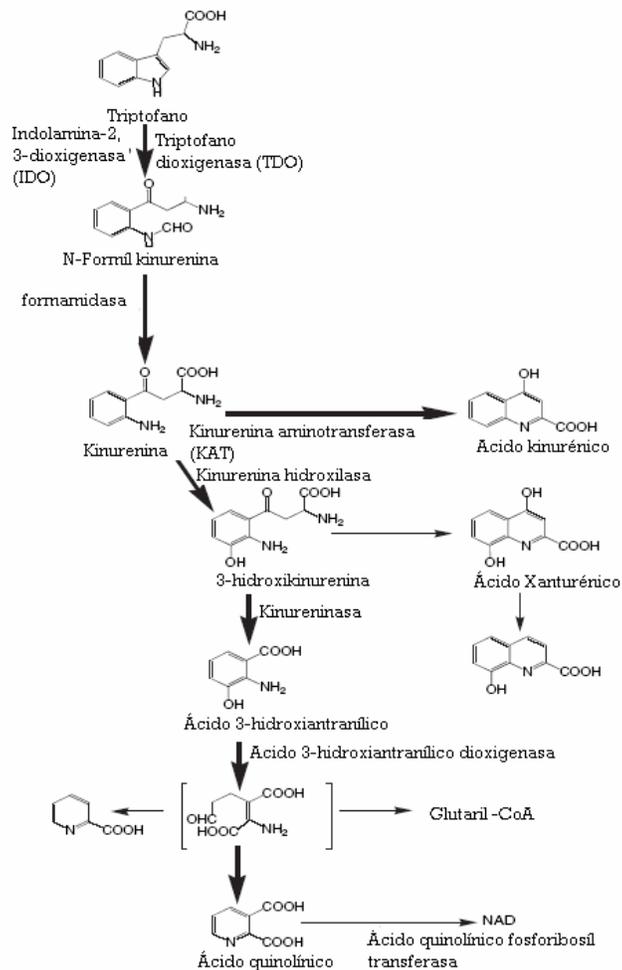


Fig 4. Vía de la kinurenina

### 3.3.2 Neurotoxicidad

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 es capaz de activar selectivamente la subpoblación de receptores glutamatérgicos sensibles a NMDA (Stone y Perkins, 1981). Así, ahora se sabe que el QUIN es un agonista de receptores a glutamato y que en altas concentraciones, o después de una larga exposición a concentraciones moderadas, es neurotóxico. El patrón de daño evocado por el QUIN en SNC se ajusta a la hipótesis de excitotoxicidad, en la cual la sobre-estimulación de receptores glutamatérgicos contribuyen al daño y muerte neuronal (Olney, 1969). La población de NMDAr (receptores NMDA) atrajo su máxima atención cuando se descubrió que su activación está asociada a un incremento sustancial en el flujo de calcio en neuronas blanco. A su vez, 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 participación en la generación de diferentes estados patológicos en el SNC a través del incremento en la conductancia para calcio. Esta toxina interactúa específicamente con los subtipos 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 y Patel, 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 y Schwarcz, 1989).

El QUIN y otras kinureninas están involucrados en la patogénesis de la neurodegeneración, procesos infecciosos e inflamatorios (Stone, 2001). El QUIN ha demostrado producir una gran variedad de eventos tóxicos en el estriado cuando es administrado a animales experimentales. Entre dichos efectos se puede citar la disminución del neurotransmisor GABA, el aumento excesivo de  $Ca^{2+}$  citosólico, el agotamiento de ATP, el estrés oxidativo y la muerte neuronal. (Santamaría y Jiménez, 2005)

### 3.3.3 Alteraciones conductuales

En cuanto a la parte conductual, Sanberg y colaboradores (1989) estudiaron las anormalidades motoras 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. Por el contrario, 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 CAT y la GAD, y que la inmunoreactividad a GABA sólo disminuyó 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 intraestriatales de QUIN y del 3-NP (toxina mitocondrial) en ratas. Se encontró 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 producir 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 presentan hiperactividad nocturna, así como una postura anormal, además de que en la prueba de recuperación de objetos, éstos animales presentaron deterioro en las respuestas consideradas de éxito (Rioitberg et al., 2002). La infusión crónica de QUIN en el estriado de rata induce además 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).

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. Así mismo, se ha reportado conducta rotatoria 6 días después de una infusión de QUIN en el estriado, y con el tratamiento con apomorfina (APO), un conocido agonista de receptores dopaminérgicos (Santamaría et al., 1996). La interpretación de dicha conducta radica en el paso de unos días de una lesión estriatal unilateral por QUIN, provoca una significativa muerte de neuronas GABAérgicas con un gran contenido de receptores dopaminérgicos, lo cual, al verse sometido a la estimulación dopaminérgica por APO, se produce un desbalance en dicha estimulación entre el lado

lesionado y el no lesionado, que a su vez genera la conducta de rotación (Schwarcz et al., 1979).

### **3.3.4 Alteraciones morfológicas**

La infusión de QUIN en el estriado de las ratas resulta en lesiones de tipo “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-sinápticos (Schwarcz y Köhler, 1983). 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 KA, respectivamente. Estos autores encontraron en SNC, que la neurotoxicidad aguda del QUIN es bloqueada por el pretratamiento con MK-801, mientras que la neurotoxicidad del KA no se altera por este pretratamiento. También encontraron que las neuronas dañadas con el KA 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, indujo 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 con 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 presentó evidencia de hinchamiento, vacuolización y lisis. En las neuronas espinosas medianas, la desintegración de las membranas plasmáticas y nucleares produjo 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 se 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. Si bien, parte de estas alteraciones han sido interpretadas como resultado de los procesos excitotóxicos inducidos por el QUIN, la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) por efecto de esta toxina se ha constituido recientemente como un posible factor causal de daño neuronal en el mismo modelo, a través del estrés oxidativo. Adicionalmente, 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 (Röh y Sievers, et al., 2007). La inmunoreactividad contra GFAP es un marcador de astrogliosis y activación astrocítica, ya que estos eventos son caracterizados por una síntesis rápida de GFAP, en situaciones severas de daño cerebral ya sea por el resultado de un trauma, enfermedad, desorden genético, insulto químico, ya que los astrocitos están envueltos en la supervivencia y regeneración neuronal (Tramontina et al., 2007).

### **3.4 Excitotoxicidad**

La excitotoxicidad neuronal involucra una elevación fisiológica de las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a una sobre-exposición de las células a la acción de los aminoácidos excitadores, tales como el Glu y el aspartato. Un disturbio en el influjo de calcio a través de NMDAr puede potenciar vías metabólicas letales que involucran enzimas degradativas (proteína cinasas, fosfolipasas, sintasas de óxido nítrico, proteasas, endonucleasas, etc.), daño mitocondrial e incremento en la formación de radicales libres (Rami y Kriegelstein, 1997), llevando así a la célula a una muerte apoptótica y/o necrótica. Estos mecanismos están involucrados tanto en desórdenes neurodegenerativos agudos (trauma) como crónicos (enfermedades de Alzheimer y Huntington) (Siesjo, 1981).

### **3.5 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se refiere a un desbalance entre la producción de ERO y defensas antioxidantes endógenas (Halliwell, 1999). Actualmente, el estrés oxidativo constituye una fuente continua de investigación que involucra diferentes patologías del SNC y modelos de toxicidad como el producido por el QUIN.

### 3.5.1 Especies reactivas del oxígeno

Un radical libre es una especie química que puede existir independientemente y contiene uno a 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 son los derivados del oxígeno (Zentella y Saldaña, 1996), ya que éste es la molécula más abundante en un sistema biológico. Las ERO son intermediarios tóxicos predominantes y están comúnmente involucrados en el estrés oxidativo (Kehrer, 2000). En la siguiente tabla se muestran una lista parcial de las ERO:

<b>RADICALES</b>	<b>NO RADICALES</b>
Anion 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 perhidroxilo ( $\cdot OOH$ )	Oxígeno singulete ( $^1O_2$ )
Radical alcoxilo ( $\cdot OR$ )	

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno.

Las ERO son continuamente producidas durante eventos fisiológicos, pero pueden iniciar fácilmente la peroxidación de lípidos en membrana, llevando así a la acumulación de peróxidos lipídicos. Las ERO incluyen radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y especies no radicales como el  $H_2O_2$  y oxígeno singulete ( $O_2$ ), u otras formas de oxígeno activado. Estas moléculas son factores que exacerban el daño celular y procesos de envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Generalmente las ERO son removidas por mecanismos de defensa antioxidante. Así, existe un balance entre la generación de ERO y su inactivación por sistemas antioxidantes en los organismos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, Alzheimer, Parkinson, entre otros las ERO son sobreproducidas y llevan invariablemente a estrés oxidativo (Ramos et al., 2006).

### **3.6 Agentes Antioxidantes**

Los antioxidantes pueden proteger al cuerpo de los radicales libres y de los efectos de las ERO, así como coadyuvar al retraso progresivo de varias enfermedades crónico-degenerativas, y de mecanismos como la peroxidación lipídica.

De manera general, los antioxidantes se clasifican en dos tipos: endógenos y exógenos - aquellos derivados de la dieta. El organismo posee su propia capacidad antioxidante, que puede derivar de fuentes enzimáticas y no enzimáticas. Entre las primeras, son esencialmente 3 enzimas antioxidantes endógenas: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). Entre los antioxidantes no enzimáticos están el glutatión (GSH), el ácido lipóico (LA), L-carnitina (L-CAR), la melatonina, la deshidroepiandrosterona (DHEA), y otros productos diversos de reacciones catalizadas por enzimas que son controladas en respuesta al estrés oxidativo (Zana et al., 2007).

La suplementación con antioxidantes exógenos juega un papel importante en el tratamiento, o al menos en el retraso de la progresión de las enfermedades, particularmente compensando la disminución en el nivel de los antioxidantes endógenos y en el suministro de antioxidantes que no son sintetizados por los humanos. (Zana et al., 2007)

Los antioxidantes, al conjugarse con el radical libre, le ceden un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre no tóxico, que en algunos casos puede reconstituirse a su forma original por la acción de otros antioxidantes. Obviamente, no todos los antioxidantes actúan de esta manera; los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reducciones químicas que utilizan sustratos que a su vez funcionan con ellos. Cada antioxidante posee afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios. (Zana et al., 2007)

Por otra parte, entre otros antioxidantes no enzimáticos (a los cuales se les llama atrapadores de radicales) podemos citar algunos como la glicina, la taurina y el tripéptido glutatión. En condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen baja concentración de radicales en la célula, que a su vez mantiene una actividad muy precisa y regulada; de aquí que el equilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes determinen el grado de estrés oxidativo. (Ramos et al., 2006).

De manera general, los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:

- Al disminuir la concentración de pro-oxidantes.
- Al evitar la iniciación de la reacción en cadena, al atrapar a los radicales que se forman.
- Al unirse a iones metálicos para evitar la formación de ERO.
- Al transformar los peróxidos en productos menos reactivos.
- Al detener la propagación y aumento de radicales.

### 3.7 L-Carnitina

El ácido 4-N-trimetilamonio-3-hidroxi-butírico - también conocido como L-carnitina - es una amina cuaternaria sintetizada a partir del aminoácido lisina. Cerca del 75 % de las reservas corporales de carnitina provienen de la dieta: carne roja en adultos y leche en lactantes. En el hombre, el 25 % de la carnitina es sintetizada por el riñón e hígado a partir de su precursor inmediato, la gama-butirotetaina. La concentración total de carnitina es mayor en corazón y en músculo esquelético que en el hígado y riñón, mostrando así el mayor grado de metabolismo oxidativo de ácidos grasos en músculo y corazón (Arenas et al., 1998).

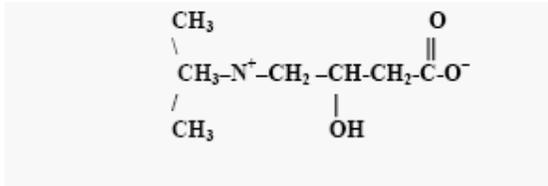


Fig 5. Estructura de la L-carnitina

L-carnitina juega papeles fisiológicos importantes, transportando ácidos grasos de cadena larga, cruzando la membrana interna para la  $\beta$ -oxidación y para la producción de ATP en tejidos periféricos. La L-carnitina juega su mayor papel como un cofactor en el transporte de ácidos grasos libres del citosol a la mitocondria, transportando acetil-CoA dentro del citoplasma durante la movilización de acetil-L-carnitina fuera de la mitocondria. A pesar del bajo nivel de  $\beta$ -oxidación en el cerebro, la L-carnitina es transportada activamente a través de la barrera hematoencefálica, y se acumula en células neuronales (Gómez et al., 2006). Así mismo, la L-carnitina es un cofactor importante de oxidación peroxisomal, especialmente para ácidos grasos de cadena larga ( $C_{n>C_{22}}$ ), debido a la localización de una acetiltransferasa de carnitina, acetiltransferasas de la matriz y citosol, y carnitina-acilcarnitina translocasa en peroxisomas (Gülcin, 2006).

Los roles fisiológicos de la L-carnitina son:

- Oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga,
- Activación de glucólisis aeróbica: estimulación del complejo piruvato deshidrogenada
- Aumento de la función de la cadena respiratoria
- Modulación de la pareja mitocondrial acil CoA/CoA
- Sistema atrapador de grupos acilos
- Oxidación peroxisomal de ácidos grasos; comunicación intracelular
- Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada
- Estabilización membranal
- Donador de grupos acetilo para biosíntesis
- Actividad antioxidante

### **3.7.1 Propiedades antioxidantes y precursoras del metabolismo energético de la L-carnitina**

La L-carnitina previene el estrés oxidativo, regula el óxido nítrico y la respiración celular, así como la actividad de enzimas involucradas en la defensa contra el daño oxidativo (Gómez et al., 2006). Es un potente atrapador de ERO en tejido de mamíferos (Kalaiselvi y Panneerselvam, 1998). También se ha reportado que la L-carnitina previene la toxicidad inducida por Glu y KA en cultivos de células neuronales (Tastekin et al., 2006).

Una función extremadamente importante de la L-carnitina es el transporte membranal de ácidos carboxílicos que han sido activados a nivel de CoA, confiriéndole así a esta molécula la habilidad de transportador, y facilitando la liberación de nuevo sustrato, eliminando toxinas, atrapando compuestos acetilados de origen endógeno y exógeno (protegiendo de una acidosis metabólica), y favoreciendo el transporte de alta energía desde una localización subcelular o celular a otra (Bayés et al., 2001).

La conversión de L-carnitina a acetil-L-carnitina por la acetil-CoA en el SNC habilita capacidad de remover grupos acetilos de la mitocondria al citoplasma, y por lo tanto, provee sustrato para la síntesis de acetilcolina. La L-carnitina también aumenta el metabolismo de la glucosa y la oxidación de carbohidratos como consecuencia del control de la piruvato deshidrogenasa inhibida por los grupos acetilos (Binienda et al., 1996).

Adicionalmente, la L-carnitina preserva las funciones mitocondriales en varias células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hino et al., 2005), al tiempo que disminuye el decaimiento en la función mitocondrial dependiente de la edad, incluyendo en este proceso la restauración del potencial de membrana, el contenido de cardiolipina, el consumo metabólico de oxígeno y la oxidación de ácidos grasos. Todo lo anterior permite sugerir a la L-carnitina como un buen precursor y modulador del metabolismo energético celular, y como una herramienta de interés y alto potencial terapéutico en la modulación del estrés oxidativo y déficit energético en modelos de daño neuronal que involucren alteración en la función mitocondrial, tales como el Parkinson, Alzheimer, etc. (Wang et al., 2007).

#### **4. HIPOTESIS**

Debido a las propiedades antioxidantes y precursoras del metabolismo energético ampliamente reportadas para la L-carnitina disminuirá la toxicidad evocada por la infusión de QUIN en el estriado de ratas, la cual se observará como una disminución de la conducta de rotación y de la expresión de GFAP.

#### **5. OBJETIVOS**

##### General

- Evaluar el efecto de una administración sistémica de L-carnitina sobre dos marcadores de neurotoxicidad inducidos por el QUIN en ratas

##### Particulares

- Monitorear el efecto de la L-carnitina sobre la conducta de rotación, en el modelo neurotóxico de EH provocado por el QUIN
- Evidenciar y cuantificar el efecto de la L-carnitina sobre la incrementada reactividad contra GFAP provocada por la infusión de QUIN estriatal como marcador de daño neuronal

## **6. PARTE EXPERIMENTAL**

### **6.1 Sujetos de experimentación**

Para realizar esta investigación, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (280-320 g) del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar (temperatura constante de 25 °C, con ciclos de luz normal de 12 horas y con libre acceso a comida y agua).

### **6.2 Materiales y reactivos**

- L-carnitina
- Ácido quinolínico
- Apomorfina
- Pentobarbital sódico de uso veterinario
- Solucion salina isotónica (0.9 % NaCl)
- Buffer fosfatos a pH 7.4 (PBS)
- Parafina
- Alcohol absoluto G.R.
- Paraformaldehído G.R.
- Xilenos G.R.
- Kit de DAKO contra GFAP
- Aparato estereotáxico
- Micrótopo rotatorio 820 HistoSTAT
- Microscopio de luz (Leica DMLS Galen III) con una cámara digital a color (SSC-DC14) acoplada

Se utilizó agua destilada para la preparación de soluciones y reactivos.

## **6.3 Métodos**

### **6.3.1 Pretratamiento con L-carnitina e inyección intraestriatal con QUIN**

Se diseñaron 4 grupos experimentales de seis animales cada uno:

- 1) S.S.I. intraperitoneal (i.p.) + S.S.I. intraestriatal (i.e.)
- 2) L-carnitina intraperitoneal (i.p.) + S.S.I. intraestriatal (i.e.)
- 3) S.S.I. intraperitoneal (i.p.) + QUIN intraestriatal (i.e.)
- 4) L-carnitina intraperitoneal (i.p.) + QUIN intraestriatal (i.e.)

La solución intraperitoneal fue administrada una hora antes de la inyección intraestriatal. La concentración de la solución de L-carnitina administrada fue de 100 mg/kg, en una concentración de (60mg/mL) de peso de animal. Transcurrida 1 hora de la administración intraperitoneal, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso del animal) y posteriormente inyectadas unilateral y estereotáxicamente (coordinadas de acuerdo al Atlas estereotáxico de cerebro de rata de Paxinos y Watson, 1984) en el estriado derecho con S.S.I. (0.9 % NaCl) ó QUIN (240 nmol/ $\mu$ L), de acuerdo al grupo experimental.

### **6.3.2 Medición de conducta de rotación**

Seis días después de la lesión estriatal se administró apomorfina (APO) a todos los animales en una dosis de 2.5 mg/Kg, en una concentración de (1.25mg/mL) . de peso vía subcutánea (s.c.); cada animal se mantuvo de forma individual en una caja de acrílico para su observación. Cinco minutos después de la administración de APO, se registró el número total de giros ipsilaterales (en sentido del hemisferio lesionado, lado derecho) de cada animal durante 60 min. Cada rotación se define como un giro completo de 360° sobre sus patas traseras.

### **6.3.3 Perfusión y obtención de cerebro completo**

Después de haber medido la conducta rotacional, las ratas fueron anestesiadas con eter, para posteriormente ser perfundidas vía intracardiaca, primero con S.S.I. + heparina, y después con una solución de paraformaldehído (4 %). Posteriormente, se extrajeron los cerebros completos de cada animal, los cuales se conservaron en una solución de paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4) para su posterior tratamiento.

#### **6.3.4 Inclusión en parafina**

A continuación se detalla el método de inclusión:

- 1.-Sacar cerebros de paraformaldehído, colocarlos uno por uno dentro de las cajas de lavado e identificarlos.
- 2.-Colocar los cerebros bajo el chorro de agua corriente por 15 min.
- 3.- Colocar las cajas de lavado con los cerebros durante una hora en agitación constante en cada uno de los reactivos, en el siguiente orden:
  - Alcohol 70%
  - Alcohol 80%
  - Alcohol 96%
  - Alcohol 96%
  - Alcohol absoluto.
  - Alcohol absoluto
  - Alcohol – xilol (1:1)
  - Alcohol - xilol (1:1)
  - Xilol absoluto
  - Xilol absoluto
  - Parafina
  - Parafina

4.- Al realizar el último lavado, se procede a incluir los cerebros en parafina, sacando los cerebros de la caja de lavado y colocándolos en moldes de plástico flexible, cubriéndolos completamente con parafina.

5.- Dos días después de haber colocado en parafina los cerebros, se realizan cortes de 7  $\mu$ m para cada cerebro en el micrótopo rotatorio 820 HistoSTAT. Se colocan en portaobjetos para su posterior uso en las pruebas inmunohistoquímicas.

#### **6.3.5 Inmunohistoquímica contra GFAP**

Para la prueba inmunohistoquímica contra GFAP, (Kit de DAKO, Dakocytomation, Carpintería, CA), a continuación se describe el método:

- 1.-Colocar laminillas en xilol durante 30 min.
- 2.-Enjuagarlas con agua corriente.
- 3.-Colocar las laminillas en una solución de citrato de sodio 10 mM y tritón al 10 %, en baño María y dejarlo hervir durante 30 min. Posteriormente, enfriar en agua fría por 10 min.

- 4.-Enjuagar con PBS (pH 7.4).
- 5.-Colocar las laminillas en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min.
- 6.-Enjuagar con PBS.
- 7.- Secar laminillas alrededor del corte, colocar sobre el corte albúmina (2 %).
- 8.- Enjuagar con PBS.
- 9.-Incubar con anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal que reconoce a GFAP, DAKO, dilución 1:100 con PBS) durante una noche en refrigeración.
- 10.- Enjuagar con PBS.
- 11.- Incubar con el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa de rábano rojo, Kit Dako).
- 12.-Enjuagar con PBS.
- 13.-Secar y agregar DAB (diaminobencidina, Kit DAKO), esperar un minuto hasta observar el viraje de color rojo a café claro.

### **6.3.6 Tinción de laminillas y contraste de núcleos**

Después del tratamiento con los anticuerpos se procede a:

- 1.- Lavar laminillas con agua corriente durante 5 min.
- 2.-Sumergir las laminillas durante 50 seg en Hematoxilina de Gill.
- 3.-Enjuagar con agua corriente 2 veces.
- 4.-Colocar laminillas en los siguientes reactivos:
  - Alcohol de 96%, 2 enjuagues.
  - Alcohol de 96%, por 3 min.
  - Alcohol de absoluto por 3 min.
  - Alcohol absoluto por 3 min.
  - Xilol absoluto por 3 min.
  - Xilol absoluto por 3 min
- 5.-Secar laminillas y colocar la resina; colocar cubreobjetos.

Al terminar, los cortes fueron observados al microscopio de luz (Leica DMLS Galen III) con una cámara digital a color (SSC-DC14) acoplada.

### 6.3.7 Conteo de células reactivas

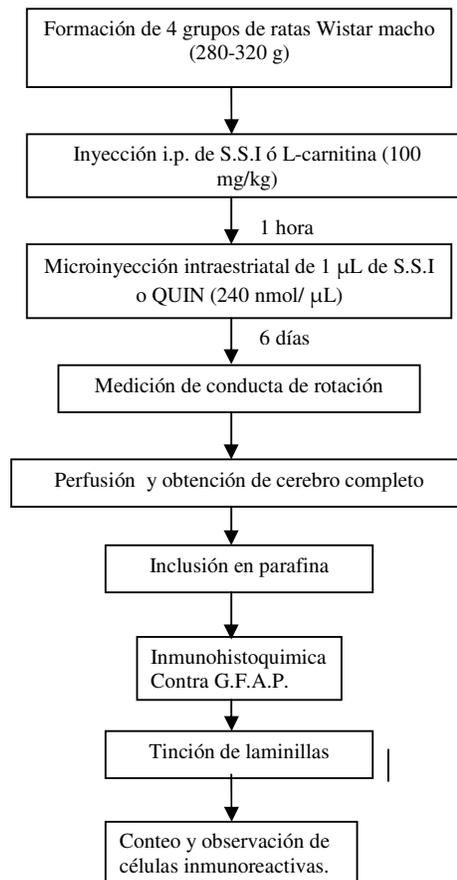
Para el conteo de células inmunoreactivas para GFAP se considero un campo en un aumento 40x de tres ratas por cada grupo. El área del campo analizado es de  $4700 \mu\text{m}^2$ , y todos los campos equidistantes a la zona de lesión a  $371 \mu\text{m}$ .

### 6.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico para datos conductuales y conteo de células inmunoreactivas a GFAP se uso un software estadístico Sigma Stat ® (Version 2.0,1992-1997) aplicando un ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar medio (EEM)

### 6.5 Diagrama de flujo

A continuación se describe de manera esquemática el procedimiento experimental de este trabajo.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de la L-carnitina sobre la conducta de rotación inducida por QUIN

En la Fig. 6 se muestra el efecto de la L-carnitina sobre la conducta rotatoria inducida por el QUIN en animales lesionados estriatalmente. Observamos que el QUIN aumentó significativamente la conducta de rotación con respecto al control. Por su parte, la L-carnitina sola no muestra cambios significativos con respecto al control, mientras que la L-carnitina bloqueó totalmente la conducta rotatoria inducida por el QUIN.

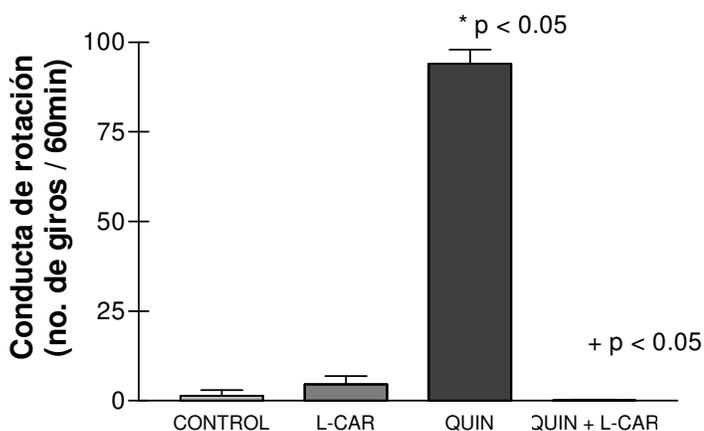


Fig.6 Efecto de la L-carnitina sobre la conducta rotacional inducida por el QUIN en ratas. Los animales se colocaron individualmente en cajas de acrílico, y después de su habituación se les administró APO (2.5 mg/kg, s.c.). Los giros se midieron visualmente durante 60 min. Las columnas representan promedio  $\pm$  EEM para los 4 grupos (n=5). \* denota una diferencia significativa de  $p < 0.05$  vs. Control; + representa diferencia de vs. QUIN. ANOVA de una vía  $p < 0.001$ , seguido de una prueba de Tukey  $p < 0.05$ .

## 7.2 Efecto de la L-carnitina sobre la inmunoreactividad contra GFAP inducida por el QUIN en cuerpo estriado

En la Fig. 7a. se presentan las micrografías correspondientes al estudio inmunohistoquímico contra GFAP. Observamos una mayor reactividad contra GFAP en el tejido tratado con QUIN respecto al control; también observamos que en el tejido tratado con L-carnitina no hubo reacción contra GFAP comparado con el control. La L-carnitina disminuyó la reactividad inmunológica evocada por la administración intraestriatal de QUIN, así como una mayor conservación de la citoarquitectura de células neuronales.

Fig. 7a

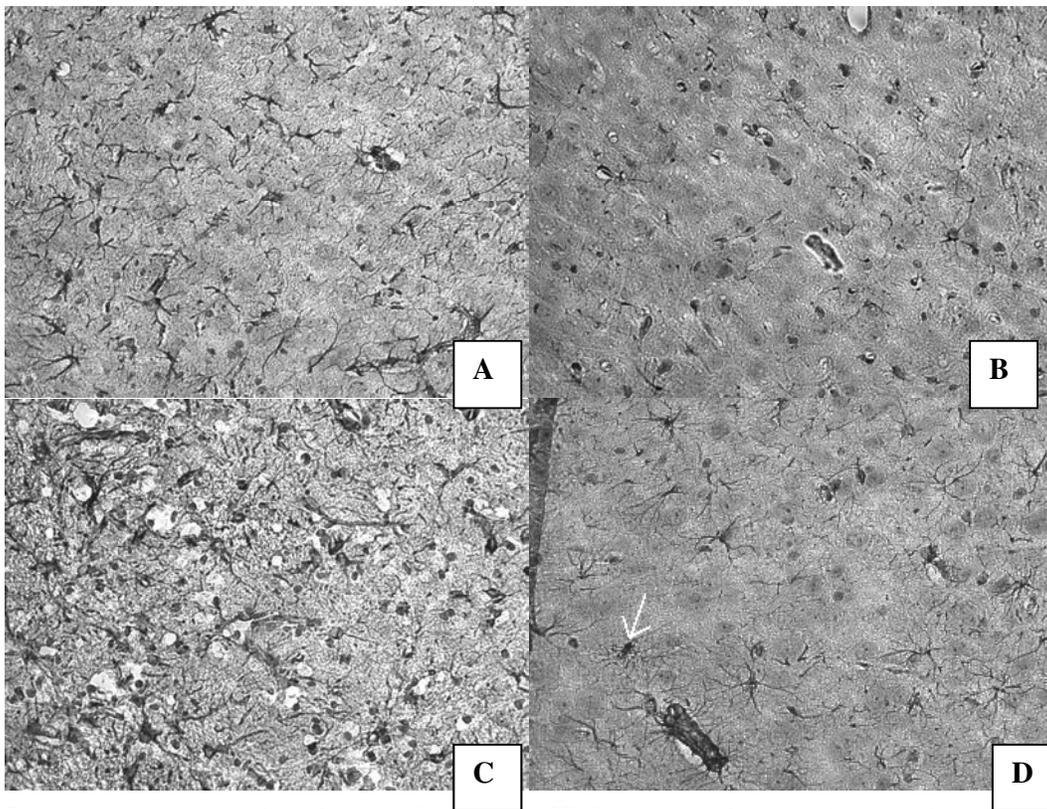


Fig 7. a) Inmunoensayos contra proteína glial fibrilar acidica (GFAP) en cuerpo estriado de ratas administradas con L-carnitina y QUIN, y b) conteo de células inmunoreactivas para GFAP. A) Control, B) L-carnitina, C) QUIN y D) QUIN + L-carnitina

En la Fig 7.b. se muestra el análisis cuantitativo correspondiente a la inmunoreactividad contra GFAP. Se confirma un mayor número de células reactivas a GFAP en el grupo de QUIN con respecto al control; también se observa una diferencia significativa en el grupo con QUIN comparado con el uso de L-carnitina + QUIN.

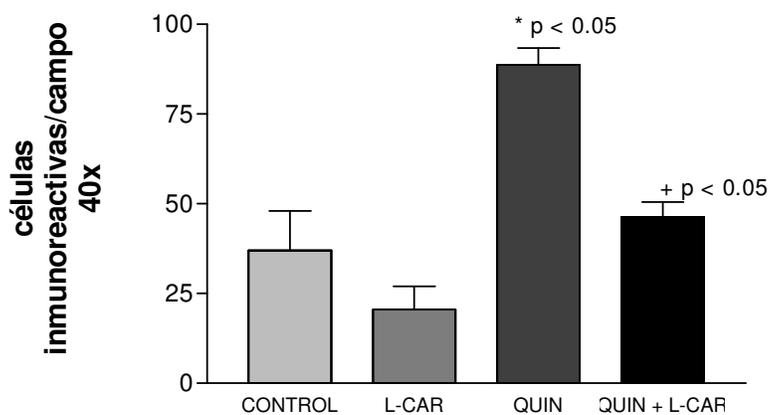


Fig 7 b) se presenta el número de células por campo 40x. Las barras muestran promedio  $\pm$  EEM (n=3). \* denota una diferencia significativa de  $p < 0.05$  vs. Control; + representa diferencia de vs. QUIN. ANOVA de una vía con  $p < 0.002$ ., seguido de una prueba de Tukey  $p < 0.05$ .

## 8 DISCUSION

En este trabajo se observó una notable protección de la L-carnitina sobre la conducta de rotación inducida por el QUIN en el modelo de la EH. Fue notable el completo abatimiento de dicha conducta, lo que sugiere un mecanismo de prevención del daño a nivel tisular del QUIN. Ya se ha reportado con anterioridad la conducta rotatoria de animales después de una infusión de QUIN en el estriado al ser tratados con APO (Santamaría et al., 1997). La conducta de rotación en este y otros modelos, se explica como el daño a neuronas del estriado que son sensibles a diversos patrones de toxicidad y que contienen GABA como principal neurotransmisor (90-95 %); así, en nuestro modelo se ha confirmado por estudios histológicos que la disminución en el contenido de GABA tras la infusión de QUIN se debe a la destrucción selectiva de neuronas GABAérgicas, y no por el daño primario en su síntesis o degradación (Harris et al., 1998). Este tipo de neuronas, a su vez, contiene sitios de unión a dopamina - receptores D1 y D2 – los cuales, al morir la neurona GABAérgica, también se afectan por la infusión de QUIN, provocando así que haya un desbalance químico entre el lado lesionado y el lado intacto (Araujo y Hilt, 1997), lo cual a su vez genera una actividad preferencial de receptores localizados en el lado intacto, y una alteración motora sensible a la administrar la APO, que siendo un típico agonista dopaminérgico (Schwarcz et al., 1979), excitará más el lado intacto que al lesionado. Nosotros sugerimos que la conducta de rotación se ve atenuada gracias a las propiedades antioxidantes de la L-carnitina y a su papel como precursor energético, ya que esta molécula podría aumentar la sobrevivencia neuronal al preservar sitios de unión a agonistas dopaminérgicos. Esto está sustentado en el hecho de que actualmente existen reportes en la literatura en los que se menciona que la L-carnitina previene el estrés oxidativo, regula la función del óxido nítrico, modula la respiración celular y conserva la actividad de enzimas envueltas en la defensa contra el daño oxidativo (Gómez et al., 2006), al tiempo que restaura funciones mitocondriales y previene la peroxidación lipídica asociada a la pérdida energética en diferentes modelos experimentales (Binienda et al., 2006).

Adicionalmente, en este trabajo los resultados de inmunoreactividad contra GFAP empleando L-carnitina como pretratamiento contra el QUIN reflejan una alta preservación celular y una baja producción de la proteína glial fibrilar ácida por efecto de este fármaco, así como un menor número de células reactivas a GFAP

cuantificadas. En contraste, la infusión de QUIN sin L-carnitina generó un alto número de células reactivas con una marcada disminución de preservación celular, lo que indica de manera indirecta un alto grado de daño neuronal provocado por esta toxina.

La GFAP es un marcador de astrogliosis reactiva y de activación de astrocitos en situaciones severas de daño cerebral, y corresponde a un fenómeno común visto en varios estados neuropatológicos en el SNC (Tramontina, 2007). Este proceso está caracterizado por la síntesis rápida de GFAP y su consecuente inmunoreactividad (Eng et al., 2000). En los modelos experimentales que inducen neurodegeneración, la activación de la microglia está comúnmente asociada a un aumento en el número de células astrogliales reactivas (Röhl et al., 2007), lo cual puede estar sugiriendo que, en el modelo producido por QUIN, que se caracteriza por procesos inflamatorios y activación de microglia, este tipo celular pueda estar contribuyendo sustancialmente a la respuesta de daño evocada por la toxina, y su resultado sea la gliosis reactiva (Santamaría y Jiménez, 2005).

En resumen, la viabilidad de la L-carnitina en este modelo para producir respuestas positivas tendientes a la neuroprotección sugiere su empleo para el estudio de mecanismos de prevención del daño neuronal más detallados en este y otros modelos experimentales, así como lo postulan como una herramienta terapéutica viable potencial en la clínica.

## **9 CONCLUSIONES**

- ✓ **El pretratamiento con L-carnitina previno la conducta de rotación provocada por el QUIN en ratas, sugiriendo preservación de tejido neuronal.**
  
- ✓ **El pretratamiento con L-carnitina atenuó la inmunoreactividad contra GFAP evocada por la infusión de QUIN, sugiriendo una limitada gliosis reactiva en el estriado (índice de neurotoxicidad).**
  
- ✓ **Debido a sus propiedades antioxidantes y precursoras del metabolismo energético ampliamente reportadas, nosotros sugerimos que la L-carnitina previno el daño neuronal provocado por el QUIN probablemente a través de la preservación del metabolismo energético y de la defensa antioxidante.**

## 10 PERSPECTIVAS

Se considera realizar estudios más detallados para caracterizar el posible mecanismo de prevención de daño neuronal ejercido por la L-carnitina en el modelo de neurotoxicidad provocado por el QUIN, en los que cabe señalar los siguientes:

- ✓ Marcadores de estrés oxidativo tales como la actividad de las enzimas SOD, CAT , GPx, y la peroxidación lipídica.
- ✓ Marcadores de déficit energético tales como la medición de niveles de ATP y viabilidad mitocondrial.
- ✓ Medición de niveles estriatales de GABA como marcador neuroquímico de la toxicidad del QUIN.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Alexi T., Borlongan C., Faull R., Williams C., Clark, R., Gluckman P., y Hughes P. (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 60, 409-470.
- Araujo D.M. y Hilt D.C. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin-induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience* 81, 1099-1110.
- Arenas J., Rubio J. C., Martín M. A., y Campos Y. (1998) Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism. *Early Hum. Devel. Suppl.* 53, S43-S50
- Bayés R., Campoy C., Goicoechea A., Peinado J. M., Pedrosa T., Baena R. M., López C., Rivero M., y Molina-Font J. A. (2001). Role of intrapartum hypoxia in carnitine nutritional status during the early neonatal period. *Erl. Hum. Dev. Supp.* 65, S103-S110
- Beal M. F., Kowall N. W., Ellison D.W., Mazurek M.F., Schwartz K.J., y Martin J. B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321, 168-171
- Binienda Z., Ali S. F., Virmani A., Amato A., Salem N., y Przybyla B. D. (2006) Co-regulation of dopamine D1 receptor and uncoupling protein-2 expression in 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity: Neuroprotective role of l-carnitine. *Neurosci. Lett.* 410, 62-65
- Borlongan C., Randall T., Cahill D. W., y Sanberg P. (1995) Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Neurosci. Res.* 676, 231-234
- Borlongan C., Koutouzis T., y Sanberg P. (1997) 3-Nitropropionic Acid Animal Model and Huntington's Disease, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 289-293
- Bruyn R. P. M. y Stoof J.C. (1990) The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* 95, 29-38
- De Carvalho L. P., Bochet P., y 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.
- Di Filippo M., Picconi B., Costa C., Bagetta B., Tantucci M., Parnetti L., y Calabresi P. (2006) Pathways of neurodegeneration and experimental models of basal ganglia disorders: Downstream effects of mitochondrial inhibition *Eur. J. Pharmacol.* 545, 65-72
- Eng L.F., Ghirnikar R. S., y Lee Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-Thirti-one-years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451
- Ellerby Lisa M. (2002) Hunting for Excitement: NMDA Receptors in Huntington's Disease. *Neuron.* 33, 841-844

- Fan M. Y., y Raymond L. A. (2006) N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease Prog. Neurobiol. Artículo en prensa
- Gómez-Amores L., Mate A., Miguel-Carrasco J. L., Jiménez L., Jos A., Cameán A. M., Revilla E., Santa-María C., y Vázquez C. M. (2006) L-Carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. J. Nutr. Biochem. Artículo en prensa
- Gülcin İlhami. (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. Life scie. 78, 803-811
- Halliwell B., y Gutteridge J.M. (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
- Hardy J. y Orr H. (2006). The genetics of neurodegenerative diseases. J. Neurochem. 97, 1690–1699
- Harris C.A., Miranda A.F., Tanguay J.J., Boegman R.J., Beninger R.J., y Jhamandas K. (1998) Modulation of striatal quinolinate neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. Br. J. Pharmacol. 124, 391-399
- Hino K. (2005) L-Carnitine inhibits hypoglycemia-induced brain damage in the rat. Brain Res. 1053, 77-87
- Hunt A., y Patel A. J. (1990) Neurosci. Lett. 115, 318
- Kandel E., Schwartz J. H., y Jessell T. M. Principios de Neurociencia . 2000. 4a.ed., Ed. Mc Graw Hill Interamericana
- Kalaiselvi T., y Panneerselvam C. (1998). Effect of l-carnitine on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aging rats. J. Nutr. Biochem. 9, 575–581.
- Kehrer J. P. (2000) Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. Teratology 62, 235-236
- Khosrow Tayebati S. (2006) Animal models of cognitive dysfunction. Mechanisms of Ageing and Development . 127 100–108
- Köhler C. y Schwarcz R. (1983) Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study. Neurosci. 8, 819-851
- Kumar U. (2004) Characterization of striatal cultures with the effect of QUIN and NMDA. Neurosci. Res. 49, 29-38
- Martinez A. y Rábano A. (2002) Anatomía patológica de la enfermedad de Huntington. Rev. Esp. Patol. 35, 517-528
- Mansour H. (2006) Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. Pharmac. Res. 54, 165-171
- Miranda A.F., Sutton M.A., Beninger R.J., Jhamandas K., y Boegman R.J. (1999) Quinolinic acid lesion of the nigrostriatal pathway: effect on turning behaviour and protection by elevation of endogenous kynurenic acid in rattus norvegicus. Neurosci. Lett. 262, 81-84

- Moroni F., Russi P., Gallo-Mezo M. A., Moneti G., y Pellicciari R. (1991) Modulation of quinolinic and kynurenic acid content in the rat brain: effects of endotoxins and nicotinyllalanine. *J. Neurochem.* 57, 1630-1635.
- Muthuswamy A., Vedagiri K., Ganesan M., y Chinnakannu P.(2006) Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of l-carnitine and dl-a-lipoic acid. *Clin. Chim.* 368, 84 – 92
- Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597
- Norman A. B., Calderon S. F., Giordano M., y Sanberg P. R. (1988) Striatal tissue transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral kainic acid lesions. *Neuropharmacology.* 27, 333-336
- Olney J. W. (1969) Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
- Paxinos G. y Watson. (1984). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney
- Pérez-De La Cruz V. y Santamaría A. (2006) Integrative hypothesis for Huntington's disease: A brief review on experimental evidence. *Physiol. Res.* Artículo en prensa
- Petersén A., Mani K., y Brundin P. (1999)Recent Advances on the Pathogenesis of Huntington's Disease *Exp. Neurol.* 157, 1–18
- Petzol A. Green A. J. E., Giovannoni G., y Thompson E. J. (2004) An ELISA for glial fibrillary acidic protein. *J. Immunol. Methods* 280, 169-177
- Pieczenik S. y Neustadt J. (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease *Experimental and Molecular Pathology* Article in press
- Portera-Cailliau C., Hedreen J. C., Price D. L., y Koliatsos V. E. (1995) Evidence for apoptotic cell death in huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15, 3775-3787
- Portera-Cailliau C., Price D. L., y Martin L. J. (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
- Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Katz L., LaMantia A., y McNamara J. *Invitación a la neurociencia.* 2001. 1ª. ed. Ed. Medica Panamericana
- Rami A., Ferger D., y Kriegstein J. (1997) Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci. Res.* 27, 93-97.
- Ramos M. L., Batista C., Gómez B., y Zamora A. (2006) Diabetes estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv. salud* 8, 7-15
- Röhl C., Lucius R., y Sievers J. (2007) The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res.* 1129, 43-52

- Rodríguez-Martínez E., Camacho A., Maldonado P.D., Pedraza-Chaverri J., Santamaría D., Galván-Arzate S., y Santamaría A. (2000) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 858, 436–439
- Roitberg B. Z., Emborg M. E., Sramek J. G., Palfi S., y Kordower J. H. (2002). Behavioral and morphological comparison of two non-human primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery* 51, 852-853
- Sanberg P. R., Calderon S. F., Giordano M., Tew J. M., y Norman A. B. (1989). The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor Abnormalities. *Exp. Neurol.* 105, 45-53
- Sanberg P. y Emerich F. (1990) Neural Basis of Behavior: Animal Models of Human Conditions *Brain Res.* 25, 447-451
- Santamaría A., Ríos C., Solís-Hernández F., Ordaz-Moreno J., González-Reynoso L., Altagracia M., y Lrvazov J. (1996) Systemic DL-kinuranine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 35, 23-28
- Santamaría A. y Jimenez M. (2005). Oxidative/ nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms : an overview. *Curr. top. Neurochem.* 4, 1-20
- Santiago-López, Vázquez-Román B., Pérez-De La Cruz V., Barrera D., Rembao D., Salinas-Lara C., Pedraza-Chaverri J., Galván-Arzate S., Ali S., y Santamaría A. (2004) Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54, 233-238
- Schwarcz R., Fuxe K., Agnati L. F., Hökfelt T., y Coyle J. T. (1979) Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res.* 170, 485-495
- Schwarcz R. y Köhler C. (1983) Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 38, 85-90
- Sei Y., Fossom L., Goping G., Skolnick P., Basile A. S. (1998). Quinolinic acid protects rat cerebellar granule cells from glutamate-induced apoptosis. *Neurosci. Lett.* 241, 180
- Seifried H., Anderson D. E., Fisher E. I., y Milner J. A. (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species *J Nutr Biochem.* Artículo en prensa
- Shear D., Dong J., Haik-Creguer K. L., y Dunbar G. L. (1998) Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of huntington's disease. *Reg. Neum-Psychopharmacol & Biol. Physiat.* 22, 1217-1240
- Shear D. A., Dong J., Haik-Creguer K. L., Bazzet T. J., Albin R. L., y Dunbar G.L. (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.
- Siesjo B. K. (1981). Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1, 155-185

- Soon-Tae Lee, y Manho Kim (2006) Aging and neurodegeneration Molecular mechanisms of neuronal loss in Huntington's disease. *Mech. Ageing and Dev.* 127 , 432–435
- Stone T.W., Perkins M.N. (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 411-412
- Stone Trevor W., (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Reviews.* 45, 306-340
- Stone Trevor W. (2001) Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicol.* 39, 61-73
- Susel Z., Engber T. M. , Kuo S., y Chase T. N. (1991). Prolonged infusion of quinolinic acid into rat striatum as an excitotoxic model of neurodegenerative disease. *Neurosci. Lett.* 121, 234-238
- Tastekin A., Gepdiremen A., Ors R., Buyukokuroglu M., y Halici Z. (2005) L-carnitine protects against glutamate- and kainic acid-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rats . *Brain and Dev.* 20, 570-573
- Tastekin A., Gepdiremen A., Ors R., Buyukokuroglu M. E., y Halici Z.(2006) Protective effect of L-carnitine against bilirubin-induced neuronal cell death. *Brain Dev.* 28,436-439
- Tramontina F., Leite M., Cereser K., Fraga D., Tramontina A. C., Nardin P., Andrezza A. C., Gottfried C., Kapczinski F., y Goncalves C. (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods.* Artículo en prensa
- Trushina E. y McMurray C.T. (2007) Oxidative stress and mitochondrial in neurodegenerative diseases. *Neurosci.* Artículo en prensa
- Wang C., Sadonova N., Ali H. K., Duhart H. M., Fu X., Zou X., Patterson T. A., Binienda Z. K., Virmani A., Paule M. G., Slikker W., y Ali S. (2007). L-Carnitine protects neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal apoptosis in rat forebrain culture. *Neurosci.* 144, 46–55
- Whetsell W. O. Jr., y 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
- Zana M., Janka Z., y Kálman J. (2007) Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 648–676
- Zentella M., y Saldaña Y. (1996). Papel Fisiológico de los radicales libres. *Bol. Educ. Bioquímica* 15, 152-161