



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**NEUROPROTECCIÓN POR LA L-CARNITINA Y LA
S-ALILCISTEÍNA COMO POST-TRATAMIENTOS EN
MODELOS DE DAÑO NEURONAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

Diana Elinos Calderón



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL.**

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

| |
|---|
| <p>1. Datos del alumno Elinos Calderón Diana 56 75 54 92 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 303272447</p> |
| <p>2. Datos del Tutor Doctor Abel Santamaría Del Ángel</p> |
| <p>3. Datos del Sinodal 1 Dr. José Pedraza Chaverri</p> |
| <p>4. Datos de Sinodal 2 Dra. Laura Colín Barenque</p> |
| <p>5. Datos de Sinodal 3 Dra. Irma Daniela González Herrera</p> |
| <p>6. Datos de Sinodal 4 Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez</p> |
| <p>7. Datos del trabajo escrito Neuroprotección por la L-carnitina y la S-calilcisteína como post-tratamientos en modelos de daño neuronal. 43 p 2009</p> |

DEDICATORIAS

Dedico ésta tesis a mis padres (Leticia y Javier), gracias por apoyarme, guiarme y quererme. Mamá sabes que eres una persona muy especial que siempre ha estado y ha sido partícipe los momentos tristes y felices de mi vida. Papá siempre has sido un ejemplo para mí y te agradezco por apoyarme en todo. Gracias por formarme y orientarme LOS AMO!!

A Uriel (“Uro”), gracias por brindarme tu amistad, apoyo y por compartir momentos y experiencias increíbles. Gracias por estar ahí siempre Te quiero mucho mi hermanito!!!

A mis tíos (Laura, Raúl, Roberto y Ricardo), quienes me vieron crecer y con los cuales he pasado momentos muy divertidos. Gracias por estar y compartir mis éxitos. Los quiero mucho!!

A mis abuelos (“Cosita” y “Papito”), gracias por consentirme y guiarme Los quiero mucho!. Rosy eres una personita maravillosa, siempre has estado conmigo gracias por todo mi “Cosita”.

A Maurito, Sarita, Rachel, Marco, Eva y Colín, gracias por estar ahí desde el inicio, por compartir viajes y conocimientos. Las experiencias maravillosas a su lado siempre estarán en mi memoria. LOS EXTRAÑO y los QUIERO MUCHO!!!

A Nallely, José, Sacbel y Víctor gracias por esas vacaciones y momentos tan divertidos que he pasado a su lado. Gracias por estar ahí y por ser mis confidentes. Los quiero mucho!!

A Martha, Claus, Itzi, Pablo, Arely, Erendira, Chucho y Rubén, gracias por demostrar su amistad y por estar en momentos malos y buenos, además de compartir experiencias muy divertidas.

A mis amigos de la vida (Pablo, Edgar, Pako, Carla y Tanys) gracias por crecer a mi lado. Los años pasarán y nuestra amistad se hará más fuerte LOS QUIERO MUCHOOO!!

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Abel Santamaría Del Ángel por guiarme y apoyarme en la realización de éste trabajo. Gracias por creer en mí, a lo largo de ésta difícil trayectoria en la investigación.

A mis sinodales:

Dr. José Pedraza Chaverri

Dra. Laura Colín Barenque

Dra. Irma González Herrera

Dra. Perla Maldonado Jiménez.

Gracias por sus observaciones y consejos.

A la Dra. Verónica Pérez De la Cruz, gracias por ser mi guía y amiga desde el principio.
TE EXTRAÑO!!!

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Aminoácidos Excitadores (Paul, Luis, Rafa, Bere, Dany y Yola) los cuales día a día con sus experiencias, comentarios y bromas me hacían el día muy feliz!!!

Gracias a la Fundación Armstrong y al Programa de Becas de Inicio a la Investigación (Probei), por brindarme el apoyo para realizar éste trabajo.

INDICE

| | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN..... | 9 |
| 1. ABREVIATURAS..... | 10 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 2.1 Excitotoxicidad..... | 12 |
| 2.1.1 Modelos excitotóxicos..... | 14 |
| 2.2. Vía de la kinurenina. | 14 |
| 2.2.1 Metabolismo de la vía de la kinurenina | 15 |
| 2.2.2 Metabolitos neuroactivos de la vía..... | 16 |
| 2.3 Ácido quinolínico | 17 |
| 2.3.1 QUIN y daño oxidante..... | 18 |
| 2.3.2. QUIN y alteraciones energéticas..... | 19 |
| 2.3.3 QUIN y muerte neuronal..... | 20 |
| 2.4. Modelos de déficit energético..... | 21 |
| 2.4.1 Acido 3-nitropropiónico..... | 21 |
| 2.4.2 3-NP y daño oxidante..... | 23 |
| 2.5 Estrés oxidante y nitrosativo..... | 23 |
| 2.5.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)..... | 24 |
| 2.5.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)..... | 25 |
| 2.5.3 Sistemas antioxidantes endógenos..... | 25 |
| 2.6 L-carnitina | 27 |
| 2.6.1 β – oxidación..... | 27 |
| 2.6.2 Efectos protectores de la L-CAR | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.7 S-alilcisteína..... | 30 |
| 2.7.1 Efectos protectores de la S- alilcisteína..... | 30 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 31 |
| 4. HIPÓTESIS | 31 |
| 5. OBEJTIVOS..... | 32 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 32 |
| 6.1 Materiales..... | 32 |
| 6.2 Obtención e incubación de fracciones sinaptosomales..... | 32 |
| 6.3 Post- tratamiento con la L-carnitina y la S-alilcisteína..... | 32 |
| 6.4 Peroxidación de lípidos <i>in vitro</i> | 33 |
| 6.5 Estimación de la función mitocondrial en fracciones sinaptosomales..... | 33 |
| 6.6 Análisis estadístico..... | 34 |
| 6.7 Diagrama de flujo..... | 34 |
| 7. RESULTADOS..... | 35 |
| 7.1 Efecto del QUIN y/o el 3-NP sobre la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial después de 1, 3 y 6 h..... | 35 |
| 7.2 Efectos de la L-CARNITINA como post-tratamiento..... | 36 |
| 7.2.1 La peroxidación de lípidos es abatida completamente por la L-CAR después de 1 h de exposición en un modelo sinérgico evocado por la administración de QUIN + 3-NP. | 36 |
| 7.2.2 La peroxidación de de lípidos es atenuada cuando la L-CAR se administra 1h después y la funcionalidad mitocondrial se recupera 3 h después de la exposición al QUIN..... | 37 |
| 7.2.3 La L-CAR atenuó la disfunción mitocondrial evocada 3 h después de la exposición al 3-NP (Modelo de déficit energético)..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 7.3 Efectos de la S-alilcisteína como post-tratamiento..... | 40 |
| 7.3.1 La SAC recobró la funcionalidad mitocondrial 1 y 3 h después de la incubación tóxica en un modelo de déficit energético producido por el 3-NP..... | 40 |
| 7.3.2 La disfunción mitocondrial evocada durante 3 h de exposición a QUIN es atenuada por SAC | 42 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 43 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 45 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 45 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 46 |

RESUMEN

La excitotoxicidad y el déficit energético son procesos que se han visto involucrados en las patologías del sistema nervioso. Es por ello que existen modelos neuroquímicos que recrean éstos eventos, algunas neurotoxinas utilizadas son el ácido quinolínico (QUIN), que es un agonista de receptores NMDA y el ácido 3- nitropropiónico (3-NP), un inhibidor irreversible del complejo II de la cadena mitocondrial. En el presente trabajo, se evaluaron los efectos de la L-carnitina (L-CAR) y la s-alilcisteína (SAC) como post-tratamientos en tres modelos experimentales (1) un modelo excitotóxico y pro-oxidante (QUIN 100 μ M), 2) un modelo de déficit energético (3-NP 1mM) y 3) un modelo sinérgico (co-administración a concentraciones subtóxicas de QUIN y 3-NP, 21.03 μ M y 166.6 μ M, respectivamente). Después del reto farmacológico con las toxinas a diferentes tiempos (1,3 y 6 h) se administró la L-CAR y la SAC por 30 minutos y finalmente se determinó la peroxidación de lípidos (PL) y funcionalidad mitocondrial en fracciones sinaptosomales. Nuestros resultados muestran que la L-CAR disminuyó los niveles de PL 1h después en los modelos de QUIN+ 3NP (45 % por debajo del control de QUIN + 3-NP) y QUIN (50 % por debajo del control de QUIN) y recuperó la funcionalidad mitocondrial 3 horas después en los modelos de QUIN (95 % por arriba del control de QUIN) y de 3-NP (95 % por encima del control de 3-NP). Por su parte la SAC recuperó la funcionalidad mitocondrial 1h después del insulto con 3-NP (98 % por encima del control de 3-NP) y 3 h después en el modelo de QUIN (98% por encima del control de QUIN) y en el modelo de 3-NP (98% por encima del control de 3-NP). Creemos que el efecto diferencial de las dos moléculas probadas son debidas a que su modo de acción se da a diferentes niveles y a las características del modelo utilizado. Nuestros resultados sugieren que a éstos tiempos (1 y 3h) las terminales nerviosas aún son capaces de revertir el daño inducido por excitotoxicidad o déficit energético. Por lo que creemos de gran importancia evaluar otros marcadores de funcionalidad sináptica para evidenciar el mecanismo a través del cuál éstas moléculas llevan a cabo su efecto protector como post-tratamientos.

1. ABREVIATURAS

| | |
|--|----------------|
| 3- hidroxikinurenina | 3-HK |
| 3- hidroxiantranilato dioxigenasa | 3-HAO |
| Acarreador de aminoácidos excitadores neuronales 1..... | AAE1 |
| Acetil-L-carnitina | ALCAR |
| Ácido 3- hidroxiantranílico | 3-HA |
| Ácido 3- nitropropiónico | 3-NP |
| Ácido kinurénico | KYNA |
| Ácido quinolínico..... | QUIN |
| Ácido α - amino- 3- hidroxí- 5- metil- 4 isoxazolepropiónico..... | AMPA |
| Adenosin trifosfato | ATP |
| Aminoácidos excitadores | AAEs |
| Anión superóxido | $O_2^{\cdot-}$ |
| Demencia de Alzheimer | DA |
| Dióxido de nitrógeno | NO_2^{\cdot} |
| Enfermedad de Huntington | EH |
| Enfermedad de Parkinson | EP |
| Especies reactivas de nitrógeno | ERN |
| Especies reactivas del oxígeno | ERO |
| Factor nuclear Kappa B | NF-KB |
| Glutación oxidado | GSSG |
| Glutación Peroxidasa | GPx |
| Glutación reducido | GSH |
| Indolamina 2-3 dioxigenasa | IDO |
| Kinureninas aminotransferasas | KATs |
| L-carnitina | L-CAR |
| L-kinurenina | L-KYN |
| 3-(4,5 dimetiltiazol-2) 2,5 bromuro difeniltetrazolio..... | MTT |

| | |
|--|-------------------------------|
| Nicotinamida adenina dinucleótido | NAD |
| N-metil- D-aspartato..... | NMDA |
| Óxido nítrico | •NO |
| Oxígeno atómico | O |
| Oxígeno en singulete | ¹ O ₂ |
| Oxígeno molecular | O ₂ |
| Peróxido de hidrógeno | H ₂ O ₂ |
| Peroxinitrito | ONOO ⁻ |
| Polimerasa Poly (ADP-ribosa) | PARP |
| Radical hidroxilo | •OH |
| Radical peroxilo | •ROO |
| S-alilcisteína | SAC |
| Sintasa de óxido nítrico inducible | SONi |
| Sintasa de óxido nítriconeuronal | SONn |
| Succinato deshidrogenasa | SDH |
| Superóxido dismutasa | SOD |
| Transportador de aminoácidos excitadores 5 | TAAE5 |
| Transportador de glutamato 1 | GLT- 1 |
| Transportador de glutamato y aspartato..... | GLAST |
| Trasportador de aminoácidos excitadores 4 | TAAE4 |

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Excitotoxicidad

El glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central, puede causar muerte de neuronas a través de un mecanismo denominado "excitotoxicidad" (McGeer & McGeer 1976; Schwarcz & Coyle 1977; Schwarcz, Foster et al. 1984; Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008). Olney fue el primero en demostrar que el glutamato exógeno causaba lesiones en el Sistema Nervioso Central, éstos hallazgos llevaron a proponer la hipótesis de la "excitotoxicidad" por la acción del glutamato (Olney, Ho et al. 1971; Novelli, Reilly et al. 1988).

La hipótesis de excitotoxicidad postula una serie de eventos que llevan a la muerte neuronal, y se compone de tres supuestos: (a) la despolarización de la célula neuronal produce una liberación de aminoácidos excitadores (AAEs); (b) un receptor para aminoácidos excitadores común en el botón postsináptico, regula la excitación y la toxicidad, y (c) la propagación de la cadena de eventos genera una disfuncionalidad neuronal y muerte (Bondy & LeBel 1993). La premisa de la hipótesis le da un rol más importante a los aminoácidos excitadores en el mecanismo de varios desórdenes cerebrales, incluyendo isquemia cerebral, epilepsia, el Alzheimer y la enfermedad de Huntington (Schurr, West et al. 1992).

El glutamato activa tres diferentes subtipos de receptores en las neuronas postsinápticas: receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA); receptores no NMDA, sensibles a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y a ácido kaínico; y receptores metabotrópicos (Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008). Tradicionalmente, los receptores que están más involucrados con los procesos excitotóxicos son los receptores ionotrópicos para glutamato, de estos los más estudiados son los NMDA (Forder & Tymianski 2009), aunque también los receptores no NMDA tienen un papel importante en el proceso.

La activación de los receptores no NMDA lleva a una entrada de Na^+ y consecuentemente a una despolarización de la membrana plasmática, promoviendo así la salida del ion magnesio que normalmente bloquea el canal del receptor NMDA. Una vez activado el receptor para NMDA hay un flujo al interior de la célula de Na^+ y de Ca^{2+} (Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008). Por otro lado, los receptores metabotrópicos también podrían estar involucrados en el mecanismo, ya que están unidos a proteínas G y producen la activación de segundos mensajeros como el inositol 3-fosfato (IP-3), provocando así la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008).

Elevaciones excesivas en el Ca^{2+} intracelular llevan a la activación de proteasas, lipasas, fosfatasas y endonucleasas que dañan la estructura celular (Arundine & Tymianski 2003), además de que producirá alteraciones mitocondriales que afectarán su actividad, disminuyendo la producción de ATP (Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008), reduciendo así la capacidad que tienen las bombas iónicas y los intercambiadores para el mantenimiento de la homeostasis celular, y llevando finalmente a la muerte celular (Forder & Tymianski 2009). Como resultado de la disfunción mitocondrial y la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} ,

como la xantina oxidasa y la sintasa de óxido nítrico, también hay una producción de radicales libres (Lafon-Cazal, Pietri et al. 1993) que modificarán componentes lipídicos, protéicos y ácidos nucleicos que contribuyen en la cascada de muerte (Figura 1).

Aunado a esto, otro evento que contribuye al proceso de excitotoxicidad es la recaptura del glutamato, la imposibilidad de capturarlo después de su liberación sináptica lleva a la acumulación del aminoácido en la hendidura; sin embargo, existen transportadores dependientes de Na^+ localizados en las neuronas y en las células gliales que llevan a cabo esta función. Se han descrito cinco transportadores de glutamato: (1) el acarreador de aminoácidos excitadores neuronales 1 (AAAE1); (2) el transportador de glutamato y aspartato (GLAST), localizado principalmente en las células gliales; (3) el transportador de glutamato 1 (GLT- 1), localizado en neuronas y en glia; (4) el transportador de aminoácidos excitadores 4 (TAAE4), presente en las células de Purkinje en el cerebelo; y (5) el transportador de aminoácidos excitadores 5 (TAAE5), localizado en la retina (Graveland, Williams et al. 1985; Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008).



.Figura 1. Esquema de algunos eventos involucrados en el proceso excitotóxico.

2.1.1 Modelos Excitotóxicos

Debido a que los receptores ionotrópicos de glutamato representan un punto de partida en el proceso excitotóxico, los modelos experimentales para recrear el mecanismo se centran

principalmente en las funciones que algunas neurotoxinas podrían tener como agonistas de receptores NMDA y no-NMDA.

El ácido quinolínico (QUIN), el ácido kaínico, el ácido iboténico y el NMDA son algunas sustancias que activan los receptores ionotrópicos y prenden la cascada enzimática típicamente excitotóxica que finalmente llevará a la muerte celular.

Se han realizado diversos estudios comparativos para ver la magnitud de toxicidad que cada sustancia puede inducir en el cuerpo estriado, esto debido a que esta región representa un blanco importante en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, se ha observado que solo el QUIN tiene una selectividad por las neuronas estriatales (Beal, Kowall et al. 1986), por lo que el QUIN es ampliamente utilizado como modelo de la enfermedad de Huntington.

2.2 Vía de la Kinurenina

La vía de la kinurenina (Figura 2.) es la principal ruta del catabolismo del triptófano en mamíferos y es la responsable de la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+) (Beadle, Mitchell et al. 1947; Perez-De La Cruz, Konigsberg et al. 2007). Se han asociado un número considerable de funciones fisiológicas a la vía de la kinurenina, como el comportamiento o la termoregulación (Guillemin, Kerr et al. 2001; Perez-De La Cruz, Konigsberg et al. 2007).

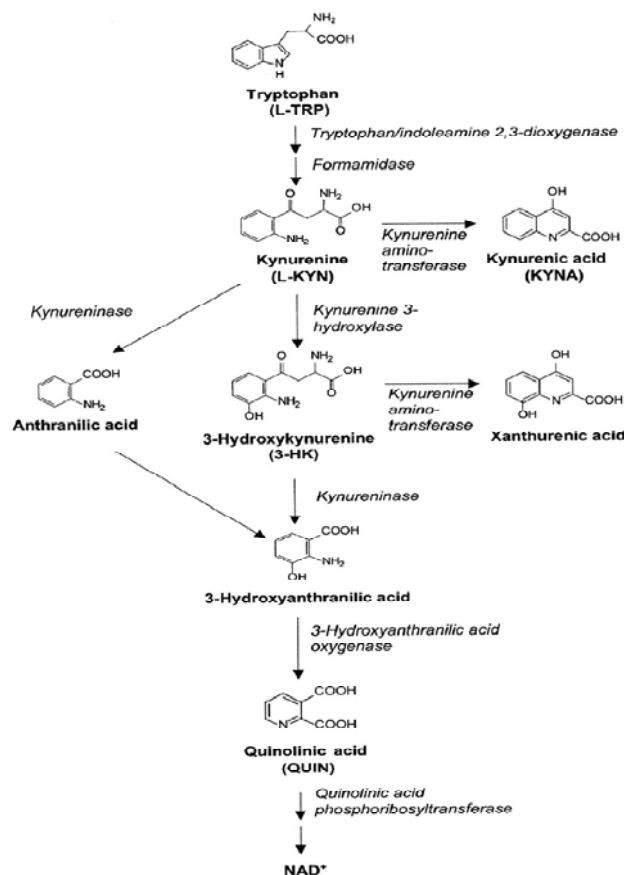


Figura. 2. Vía de la Kinurenina (Tomado de Pérez de la Cruz et al., 2007)

2.2.1 Metabolismo de la Kinurenina

En el cerebro, el anillo indólico del L-triptofano es eliminado por la indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO) para producir N-formil-kinurenina, y ésta es dependiente de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La IDO puede ser inhibida por la superóxido dismutasa (SOD) (Hirata & Hayaishi 1971; Perez-De La Cruz, Konigsberg et al. 2007) y por el óxido nítrico (Thomas, Mohr et al. 1994), además se ha sugerido que la IDO podría funcionar como un sistema antioxidante, ya que utiliza al $O_2^{\bullet-}$ para reducir su forma férrica (inactiva) a la forma ferrosa (activa) en condiciones *in vitro* (Stone & Darlington 2002).

El siguiente paso en la vía es la degradación de la N-formil kinurenina a la L-kinurenina (L-KYN) por la formamidasa. La L-KYN sirve como sustrato de diferentes enzimas: kinurenasa (formando ácido antranílico), kinurenina 3-hidroxilasa (formando 3 hidroxikiurenina), y las kinurenina aminotransferasas (KATs), que son responsables de la transaminación irreversible de la L-KYN a ácido kinurénico (KYNA). La formación de KYNA en el humano es un proceso complejo que involucra la participación de dos isoformas de la KAT, la KAT I y la KAT II. La KAT II puede ser la responsable de la mayor síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen, Hodgkins et al. 1997).

Posteriormente, la vía lleva a la formación de QUIN a través de una serie de pasos que incluyen la hidroxilación de L-KYN a 3- hidroxikinurenina (3-HK). Esta reacción es catalizada por la kinurenina hidroxilasa (Okamoto, Yamamoto et al. 1967). Luego la kinurenasa, una enzima dependiente de piridoxal fosfatos, convierte al 3-HK en ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA); después la 3-hidroxiantranilato dioxigenasa (3-HAO) abre el anillo de la 3-HA para producir 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, un intermediario inestable que inmediatamente se transforma a QUIN. Se ha demostrado por técnicas inmunohistoquímicas que la 3-HAO y las KAT's se localizan en los astrocitos que rodean las sinapsis glutamatérgicas en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Roberts, Du et al. 1992; Roberts, McCarthy et al. 1995). Finalmente el QUIN es metabolizado a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) por medio de la fosforibosil transferasa (QPRT), una enzima que también está localizada en los astrocitos (Stone 1993), aunque no está específicamente rodeando las sinapsis glutamatérgicas.

El interés en estudiar esta vía ha aumentado recientemente, desde que las alteraciones en ella se han involucrado en diversos desórdenes del SNC, como la enfermedad de Huntington (EH), la demencia de Alzheimer (DA) y la enfermedad de Parkinson (EP) (Stone 2001; Stone & Darlington 2002).

2.2.2 Metabolitos neuroactivos de la vía

A varios metabolitos de la vía de la kinurenina se les ha encontrado propiedades neuroactivas (Stone 1993). La primera evidencia de que posiblemente las kinureninas podrían estar jugando un papel importante en el cerebro fue descrita por Lapin (1978), quien describió

que el QUIN, al ser inyectado en ratones, generaba convulsiones. Desde entonces, el patrón de excitación y de neurotoxicidad producido por el QUIN se ha relacionado con la activación de los receptores NMDA.

Otro metabolito neuroactivo en la vía es el 3-HK, un precursor del QUIN que está presente en el cerebro a concentraciones nanomolares. Este muestra propiedades neuroactivas a través de la formación de radicales libres (Eastman & Guilarte 1989), dañando así a la célula y llevándola a la muerte (Okuda, Nishiyama et al. 1998). Además, el 3-HK y su producto de degradación, el 3-HA, generan $O_2^{\cdot-}$ y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de una manera dependiente de cobre, proceso que estimula la oxidación de proteínas (Goldstein, Leopold et al. 2000).

Finalmente, el KYNA se ha descrito como un compuesto inhibidor, que muestra acciones anticonvulsivas y antiexcitotóxicas (Foster, Vezzani et al. 1984). Este actúa como antagonista de receptores para NMDA al bloquear el sitio co-agonista de la glicina (Kessler, Terramani et al. 1989) y se ha demostrado que tiene la capacidad de atrapar OH^{\cdot} . Sin embargo, existen estudios que demuestran que niveles de KYNA en el estriado de animales experimentales aumentan la vulnerabilidad a eventos excitotóxicos (Poeggeler, Rassoulpour et al. 1998), mientras que la disminución de sus niveles se ha relacionado con la inhibición de la liberación de glutamato (Carpenedo, Pittaluga et al. 2001).

Por otro lado, los metabolitos de la vía también afectan componentes del metabolismo celular energético; por ejemplo, los complejos mitocondriales I, II y IV son inhibidos por el 3-HK, mientras que el 3-HA inhibe selectivamente el complejo I y II; y el QUIN inhibe los complejos II, III y II-III (Ribeiro, Grando et al. 2006; Schuck, Tonin et al. 2007). En contraste, la L-KYN y la KYNA no presentan efectos en la cadena mitocondrial, aunque el KYNA aumenta la recaptura de glucosa, indicando así que este metabolito altera el metabolismo aeróbico del cerebro (Perez-De La Cruz, Konigsberg et al. 2007).

2.3 Acido quinolínico (QUIN)

El QUIN (Figura 3) es un metabolito endógeno en la vía de la kinurenina que actúa selectivamente como agonista de receptores NMDA (Stone 1993), produciendo despolarización en la membrana y un flujo de Ca^{2+} al interior de las células neuronales, generando así daño celular cuando se prueba en concentraciones tóxicas.

Entre las alteraciones metabólicas producidas por el QUIN encontramos la reducción en el consumo mitocondrial de O_2 , disminución de los niveles de ATP y NAD^+ , y cambios importantes en las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon, Chesselet et al. 1997). Por otro lado, el QUIN es responsable de efectos tóxicos como la disminución de los niveles de GABA, peroxidación lipídica, estrés oxidante y muerte celular por apoptosis y necrosis (Santamaria & Rios 1993).

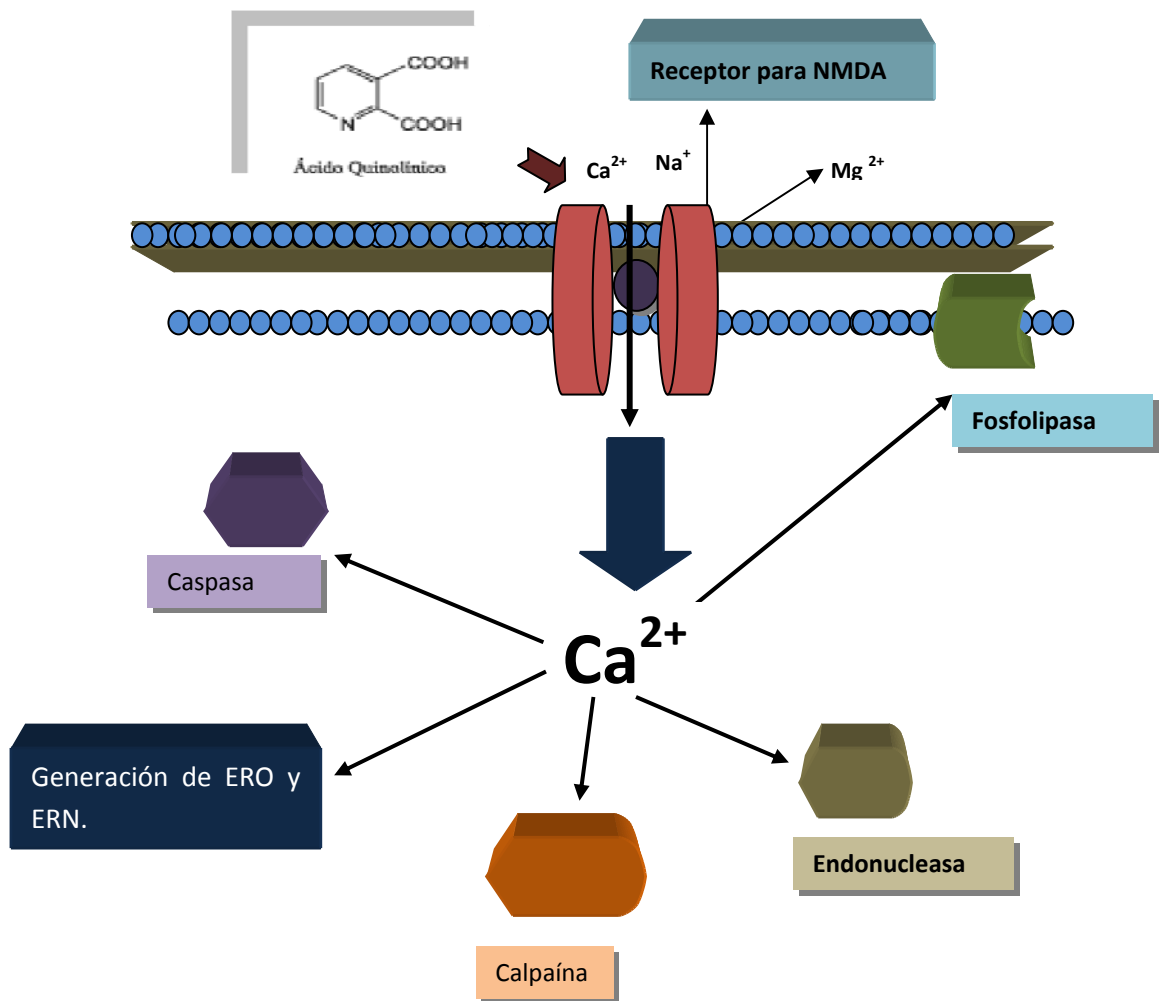


Figura 3. Estructura y mecanismo de acción del QUIN

2.3.1. QUIN y daño oxidante

La neurotoxicidad producida por el QUIN puede depender en parte de la formación de especies reactivas de oxígeno, ya que su actividad neurotóxica puede ser prevenida por agentes como la α -fenil-*t*-butilnitrona. Recientemente, se demostró que la toxina induce de

manera directa la formación de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) bajo condiciones *in vivo* en el estriado de rata en un mecanismo que parece ser parcialmente independiente de receptores para NMDA (Santamaria, Jimenez-Capdeville et al. 2001).

Otros reportes enfatizan la participación del óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y el $\text{O}_2\cdot^-$ en el daño neuronal inducido por el QUIN, demostrando así su habilidad para producir peroxinitrito (ONOO^-), una especie reactiva de nitrógeno altamente tóxica, formada ya sea en el transcurso de los días (Ryu, Kim et al. 2004) o en unas cuantas h (Perez-De La Cruz, Gonzalez-Cortes et al. 2005). Además el QUIN tiene la capacidad de inducir la expresión y actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible (SONi)(Ryu, Kim et al. 2004), aumentando así los niveles de $\text{NO}\cdot$ y disminuyendo la actividad de la enzima responsable de la detoxificación de $\text{O}_2\cdot^-$, la superóxido dismutasa (SOD), y generando estrés oxidante celular. Adicionalmente, se ha descrito la potencia oxidativa del QUIN por el incremento en la peroxidación lipídica y el daño oxidante en diferentes modelos del sistema nervioso *in vivo* e *in vitro* (Santamaria, Jimenez-Capdeville et al. 2001), enfatizando así la relevancia de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERO/ERN) durante la generación de episodios excitotóxicos. Cabe mencionar que la peroxidación lipídica producida por el QUIN puede ser prevenida por la nitro-arginina (inhibidor de la SON) y potenciada por L-arginina (precursor del $\text{NO}\cdot$), sugiriendo que el ONOO^- , un radical libre y precursor del potente oxidante, puede estar contribuyendo a la actividad tóxica del QUIN (Stone 2001).

Algunos mecanismos involucrados en la capacidad oxidante del QUIN son: 1) la formación de complejos químicos QUIN-Fe^{2+} que regularán la generación de ERN y ERO (Stipek, Stastny et al. 1997; Iwahashi, Kawamori et al. 1999), 2) la alteración de algunos sistemas antioxidantes endógenos como la SOD dependiente de Cu-Zn (Rodriguez-Martinez, Camacho et al. 2000) y 3) la generación directa de ERO y de ERN en el tejido cerebral (Santamaria, Jimenez-Capdeville et al. 2001). Estas observaciones han sido sustentadas por el uso exitoso de antioxidantes con diferentes mecanismos de acción contra la neurotoxicidad inducida por el QUIN (Perez-De La Cruz & Santamaria 2007). Finalmente, se ha demostrado la capacidad que tiene el QUIN para 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)(Rodriguez-Martinez, Camacho et al. 2000), así como su habilidad para generar radical $\text{OH}\cdot$ durante estadios tempranos de toxicidad (Santamaria, Jimenez-Capdeville et al. 2001).

2.3.2 QUIN y alteraciones energéticas

Se sabe muy poco sobre de los efectos que el QUIN puede tener en el metabolismo energético; sin embargo, se ha demostrado que inyecciones intraestriatales de 60 nmol/ul de la neurotoxina provocan una disfunción mitocondrial progresiva en el tiempo que se ve reflejada en una baja actividad de la cadena respiratoria y en una reducción de ATP, NAD^+ y en las

concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon, Chesselet et al. 1997). Además, se ha reportado que posterior a las alteraciones metabólicas, existen cambios en la actividad neuronal y en los gradientes iónicos (Bordelon, Chesselet et al. 1998).

Se ha observado además que el QUIN produce una inhibición significativa (hasta del 60 %) en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de acetato y citrato a concentraciones bajas (0.1 μM). Esta reducción probablemente represente una inhibición verdadera del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y/o de la cadena respiratoria, sugiriendo que hay un bloqueo del metabolismo aeróbico (Schuck, Tonin et al. 2007). También se ha observado que la actividad del complejo II mitocondrial, que está compuesto por la succinato deshidrogenasa más dos subunidades protéicas, está moderadamente inhibida por el QUIN (arriba del 35%) a concentraciones desde 0.1 μM , por lo que es posible que la reducción en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ causada por el QUIN pueda deberse en parte a la inhibición de la cadena respiratoria (Schuck, Tonin et al. 2007).

Tomando en cuenta estos hallazgos, puede asumirse que la glicólisis aerobia y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos están alterados por el QUIN, mientras que la glicólisis anaerobia posiblemente esté estimulada, pues esta vía genera menos ATP y se necesita más sustrato (glucosa) para compensar la baja energía que se produce (Schuck, Tonin et al. 2007).

2.3.3 QUIN y muerte neuronal

Existen reportes que vinculan los procesos de muerte celular (apoptosis y necrosis) con la exposición al QUIN. Los mecanismos por medio de los cuales podría estar actuando la neurotoxina son: (1) la activación de los receptores para NMDA que puede mediar la apoptosis neuronal por la activación de la caspasa-3 (Stone, 2001), y (2) la peroxidación de lípidos (Rios & Santamaria 1991), ya que al formar especies reactivas éstas pueden estar llevando a la célula hacia procesos de muerte (Behan, McDonald et al. 1999).

Por otro lado, se ha observado que el QUIN promueve la degradación selectiva del $\text{I}\kappa\beta$ - α (molécula de anclaje de NF- κB), pero no tiene efecto alguno en los niveles de la familia de las proteínas NF- κB , sugiriendo así que la síntesis de proteínas contribuye muy poco a la activación del NF- κB posterior a la exposición al QUIN, por lo que la activación de éste factor transcripcional puede deberse principalmente al NF- κB pre-existente. Además se encontró que la degradación del $\text{I}\kappa\beta$ - α , inducida por el QUIN es atenuada por un inhibidor de caspasa 3 (Ac-DEVD-CHO), por lo que se cree que la caspasa 3 contribuye a la degradación del $\text{I}\kappa\beta$ - α y a la activación del NF- κB debida a la sobre-estimulación de receptores NMDA (Qin, Wang et al. 2000). Sin embargo, otros autores sugieren que la muerte celular producida por el QUIN es predominantemente de tipo necrótico, ya que en el 2001 Chiarugi demostró que las células expuestas a la toxina morían principalmente por procesos necróticos, además de que antagonistas del receptor para NMDA, inhibidores de la SON neuronal (SONn) e inhibidores de PARP previenen la toxicidad inducida por QUIN. Estas observaciones sugieren que la vía de muerte responsable de la toxicidad del QUIN involucra la activación de SONn mediada por

receptores para NMDA y la activación de PARP, lo cual resulta en un colapso energético, y finalmente en la muerte celular de tipo necrótico, aunque la apoptosis y otras formas de muerte no se descartan.

2.4. Modelos 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. En estudios *in vitro* se ha demostrado que las deficiencias en el metabolismo energético, que no están acompañadas de cambios en las concentraciones de glutamato extracelular, producen daño excitotóxico secundario (Zeevalk & Nicklas 1991; Zeevalk & Nicklas 1992). La falta de oxígeno, glucosa o hipoxia inducida por toxinas mitocondriales, pueden activar de manera indirecta a los receptores para NMDA incluso con concentraciones bajas de glutamato, produciendo muerte neuronal por excitotoxicidad (Brouillet, Conde et al. 1999).

Las inyecciones directas, de una gran variedad de toxinas mitocondriales (malonato, MPP⁺, rotenona y 3-NP) en el cerebro de animales, producen un aumento en la formación de lactato, reducción de ATP y degeneración neuronal similar a la producida por el QUIN o el NMDA (Jenkins, Brouillet et al. 1996; Schulz, Henshaw et al. 1996). Se cree que el mecanismo de acción de estas toxinas mitocondriales involucra varias fases iniciadas por un desbalance metabólico crónico: despolarización de la membrana celular, liberación del Mg²⁺ que bloquea el receptor para NMDA y el subsecuente aumento en el Ca²⁺ intracelular (Greene & Greenamyre 1996); es por esto que la administración de moléculas inhibitoras del metabolismo energético son usadas como modelos de daño neuronal.

2.4.1 Ácido 3- nitropropiónico (3-NP)

La identificación inicial del 3-NP (un metabolito del 3-nitropropanol) como agente tóxico responsable de envenenamiento ocurrió en el oeste de EUA, cuando animales intoxicados con plantas como *Indigofera* o *Astragalus* presentaron varias anormalidades motoras tales como debilidad y falta de coordinación que evolucionaba fácilmente hacia la parálisis (Ludolph, He et al. 1991). Por otro lado, se reportó que la ingesta de caña de azúcar contaminada con el hongo *Arthrimum* producía altos niveles de 3-NP y también era responsable del desarrollo de ciertas encefalopatías en humanos (Brouillet, Conde et al. 1999). Estos hallazgos llevaron a utilizar al 3-NP como modelo de diversas enfermedades neurodegenerativas como la EH.

El 3-NP es un inhibidor irreversible de la SDH, una enzima localizada en la membrana interna de la mitocondria que es responsable de la oxidación de succinato a fumarato (Coles,

Edmondson et al. 1979) (Figura 4.) La toxina mitocondrial inhibe el complejo II y III de la cadena respiratoria y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Brouillet, Conde et al. 1999). Se cree que durante el tratamiento con 3-NP y antes de que se presente una reducción drástica de ATP, la alteración en la homeostasis de Ca^{2+} produce un aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico independientes de la hipersensibilidad de los receptores para NMDA. En tal caso, el Ca^{2+} que entra a través de los receptores para NMDA será suficiente para generar una sobreproducción de Ca^{2+} intracelular. En ciertas etapas de la neurodegeneración por 3-NP, cuando las reservas de ATP están muy bajas, probablemente ambos mecanismos actúen simultáneamente para producir una mayor desregulación de Ca^{2+} , activación de calpains y muerte celular (Brouillet, Jacquard et al. 2005).

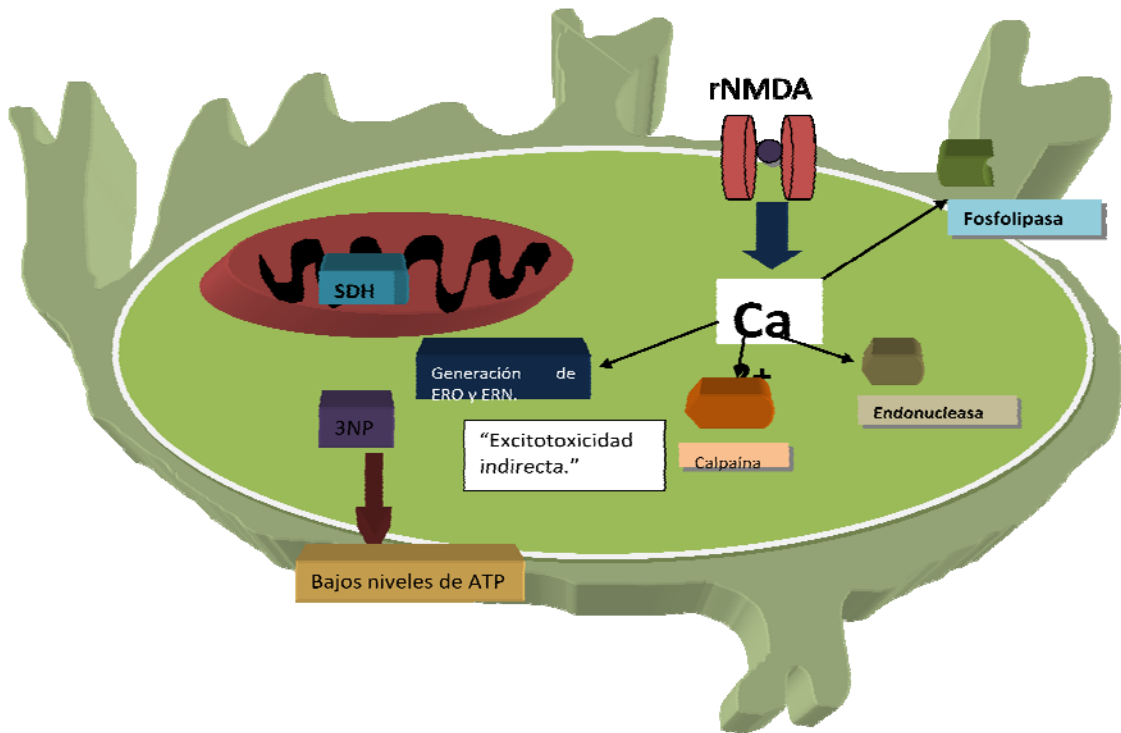


Figura 4. Mecanismo de acción del 3-NP.

2.4.2 3-NP y daño oxidante

Existe evidencia indirecta del rol del estrés oxidante en la toxicidad por 3-NP, como la reducción de los niveles de glutatión (Binienda & Kim 1997), aumento en la liberación de ácidos

grasos libres (Binienda & Kim 1997), y la neuroprotección de su toxicidad por atrapadores de radicales – como la creatina (Matthews, Yang et al. 1998) y la acetil-L-carnitina (Virmani, Biselli et al. 1995), restricción calórica (Bruce-Keller, Umberger et al. 1999) y sobre expresión de superóxido dismutasa dependiente de cobre / zinc (Beal, Ferrante et al. 1995).

Al dañar las bombas iónicas y reducir los niveles de ATP, el 3-NP produce una despolarización neuronal y remueve el Mg^{2+} que bloquea el canal del receptor para NMDA. Esto hace que los niveles de glutamato se tornen excitotóxicos (Novelli, Reilly et al. 1988; Wullner, Young et al. 1994). El flujo de Ca^{2+} a través de los receptores para NMDA genera un daño en la función mitocondrial y aumenta el estrés oxidante (Lafon-Cazal, Pietri et al. 1993; Reynolds & Hastings 1995). El aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} también lleva a la activación de la sintasa del óxido nítrico neuronal (SONn) que produce $NO\cdot$. Por otro lado, la inhibición de los complejos mitocondriales puede llevar a la fuga de éstos desde la mitocondria y producir $O_2\cdot^-$, H_2O_2 y radicales hidroxilo, dañando de esta manera las membranas de los organelos celulares.

Entonces, el 3-NP puede inducir estrés oxidante por al menos 3 vías: fuga de electrones desde la cadena respiratoria, mecanismos indirectos de excitotoxicidad y respuestas inflamatorias debidas a la degeneración neuronal (Beal, Brouillet et al. 1993). Debido a la evidencia colectada hasta ahora, se cree que el estrés oxidante y nitrosativo pueden estar involucrados en la toxicidad del 3-NP.

2.5 Estrés oxidante y nitrosativo

Un radical libre puede definirse como una molécula o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en un orbital atómico o molecular (Halliwell 1999), mientras que las especies reactivas, ya sea ERO o ERN, son aquellas moléculas que tienen la capacidad de dañar funcionalmente cualquier estructura celular sin ser necesariamente un radical libre .

Por otro lado, el término estrés oxidante se refiere al desbalance que puede ocurrir en los sistemas biológicos entre la formación de ERO/ERN y la proporción y actividad de sistemas antioxidantes, ya sean enzimáticos o no enzimáticos.

2.5.1. Especies reactivas de Oxígeno (ERO)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2 al 5 % escapa a esta reducción bivalente y ello resulta en la formación de ERO. Se consideran ERO al oxígeno atómico (O), al oxígeno molecular (O_2), al oxígeno en singulete (1O_2), al $O_2\cdot^-$, H_2O_2 y al $OH\cdot$. Las ERO no son siempre tóxicas, sino que su toxicidad depende de su concentración y del ambiente en el que se produzcan (Konisberg 2008).

El O₂, dioxígeno tiene una configuración única y por sí solo es un biradical. La unión de un electrón al dioxígeno forma el radical anión superóxido (Miller, Buettner et al. 1990). La producción de anión superóxido ocurre principalmente dentro de la mitocondria (Cadenas & Sies 1998). Durante la transformación de energía, una pequeña proporción de electrones se “salen” prematuramente, formando el radical superóxido, el cual ha sido involucrado en una gran variedad de patologías (Valko, Izakovic et al. 2004) y es considerado como la ERO más importante ya que puede interactuar con otras moléculas para generar ERO's “secundarias”, ya sea producidas de manera directa o indirecta a través de enzimas o de procesos catalizados por metales (Valko, Morris et al. 2005).

Por otro lado, el OH• es la forma neutral del ión hidróxido. Este radical tiene una alta reactividad, haciéndolo así muy peligroso y con una vida promedio muy corta *in vivo*, por lo que cuando se produce, reacciona cerca de su sitio de formación. La producción de este radical está ligada a condiciones de estrés, ya que un exceso de anión superóxido lleva a una liberación de hierro a partir de moléculas que contienen al metal, y dicha liberación puede participar en la reacción de Fenton (Figura 5), generando altas cantidades de OH•.

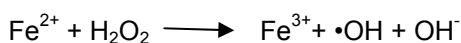


Figura 5. Reacción de Fenton.

Es por esto que el anión superóxido actúa como un oxidante ya que facilita la producción de OH• a partir de H₂O₂ al poner disponible al Fe²⁺ para la reacción de Fenton. En altas concentraciones, las ERO pueden ser importantes reguladoras de daño a las estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Valko, Rhodes et al. 2006). El radical hidroxilo puede reaccionar con todos los componentes del DNA, dañando purinas pirimidinas y desoxirribosas (Halliwell 1999). Finalmente, se sabe que la generación de ERO inducida por metales ataca no solo al DNA, sino también a otros componentes que contienen residuos de fosfolípidos, que son altamente sensibles a la oxidación (Siems, Grune et al. 1995).

2.5.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Se reconocen como ERN al NO•, el dióxido de nitrógeno (NO₂•) y el ONOO⁻. El NO• es una molécula pequeña que contiene un electrón desapareado, por lo que es un radical, y se forma a través de las SON a partir del grupo guanidino de la L-arginina. La reacción requiere de cinco electrones que son suministrados por el NADPH. En los mamíferos hay tres tipos de SON, dos son constitutivas y una inducible; las dos constitutivas se regulan con Ca²⁺ y calmodulina (Konisberg 2008). El ON no tiene carga, por lo que pasa fácilmente a través de las membranas celulares. Este reacciona rápidamente con el O₂⁻ para formar el ONOO⁻ (Figura 6), que es un potente agente oxidante que puede causar fragmentación de DNA y oxidación de lípidos (Carr, McCall et al. 2000):

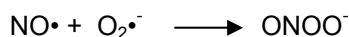


Figura 6. Reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido.

2.5.3 Sistemas antioxidantes endógenos

La exposición a radicales libres ha llevado a que los organismos desarrollen una serie de mecanismos de defensas (Cadenas 1997). Estos sistemas involucran: (i) mecanismos preventivos, (ii) mecanismos de reparación, (iii) defensas físicas y (iv) defensas antioxidantes. Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos: los enzimáticos y los no enzimáticos (Konisberg 2008).

Sistemas antioxidantes enzimáticos

1. Superóxido dismutasa (SOD): son una familia de enzimas que catalizan eficazmente la dismutación del $\text{O}_2\cdot^-$ (Figura 7):

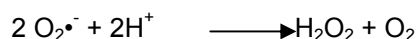


Figura 7. Reacción de la SOD.

Esta familia está formada por tres miembros, los cuales se ubican en lugares claramente específicos, dos dentro de la célula y uno extracelular. La primera enzima es una SOD que tiene en su centro catalítico un átomo de cobre y uno de zinc (SOD1 o Cu/Zn-SOD) y se ubica en el citoplasma, en el núcleo y en la membrana externa de la mitocondria. La segunda enzima está ubicada cerca de la membrana interna de la mitocondria y es una SOD que tiene un manganeso en su centro catalítico (SOD2 o MnSOD), y la tercera, la cual se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular, al igual que la primera tiene asociado un átomo de cobre y uno de zinc (SOD3 o EC-SOD) (Konisberg 2008).

2. Catalasas y peroxidasas: las peroxidasas son las enzimas responsables de eliminar los hidroperóxidos y se clasifican de acuerdo a su especificidad. Sin embargo, en términos generales, se han agrupado en catalasas y peroxidasas. Las catalasas son enzimas que descomponen al H_2O_2 directamente en O_2 y agua, y para ello emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como agente oxidante. Por su parte, las peroxidasas utilizan una molécula distinta del H_2O_2 como agente reductor (Konisberg 2008).
3. Glutatió peroxidasa (GPx): es una selenoproteína antioxidante que requiere de un tripéptido de bajo peso molecular llamado glutatió reducido (GSH) para reducir el H_2O_2 en agua. El GSH es el donador de equivalentes reductores; de ésta manera la

reducción del H_2O_2 a agua, y la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) ocurren simultáneamente (Figura 8) (Konisberg 2008).

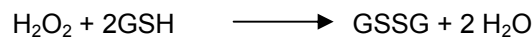


Figura 8. Reacción de la GPx.

Sistemas antioxidantes no enzimáticos

1. Carotenoides: el potencial antioxidante ejercido por los carotenoides fue descrito por primera vez en 1932; se cree que los radicales peróxidos son secuestrados e incorporados al sistema de dobles enlaces conjugados de la molécula del carotenoide, que se estabiliza en la estructura del mismo por resonancia. Los carotenoides pueden interactuar con las especies reactivas de oxígeno a través de tres maneras: (1) transferencia del electrón, (2) remoción de iones de hidrógeno y (3) adición de especies radicales (Konisberg 2008).
2. Vitamina C (ácido ascórbico): esta molécula ha sido señalada como potente antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos debido a su capacidad para secuestrar ERO y ERN. Al reaccionar con ERO/ERN, el ácido ascórbico genera el radical ascorbilo. Otro mecanismo antioxidante propuesto para el ácido ascórbico es la capacidad de regenerar antioxidantes de bajo peso molecular como el α -tocoferol (Konisberg 2008).
3. Vitamina E (α -tocoferol): su principal función es la protección de la membrana celular debida al núcleo cromanol de la molécula. La vitamina E reacciona con el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y forma el radical α -tocoferilo que funciona como agente de terminación de la cadena de peroxidación de lípidos, ayudando así a evitar su propagación (Konisberg 2008).

2.6 L-carnitina

La carnitina, un co-factor en el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria para la β -oxidación, tiene dos funciones críticas en la célula. Primero, facilita la oxidación de los ácidos grasos actuando como un co-factor en el transporte de grupos acilo a través de la membrana interna mitocondrial, y segundo, remueve de la mitocondria y de la célula grupos acilo tóxicos. Una deficiencia de L-carnitina interfiere con el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, produciendo así una acumulación de ácidos grasos libres en el citoplasma y de acil-CoA dentro

de la mitocondria. Los bajos niveles de ácidos grasos en la mitocondria limitan la β -oxidación y producen bajos niveles de energía (Savitha & Panneerselvam 2006).

La L-carnitina fue caracterizada en extractos de músculo en 1905 (Gulewitsch, 1905); su estructura química mostró ser 3-hidroxi-4-(N-trimetilamonio) butanoato, y en 1962 se identificó que su forma fisiológica era el isómero L(-) o levocarnitina. En los mamíferos, la carnitina está presente como carnitina libre y como carnitina acetilada. En humanos sanos aproximadamente de 80-85 % de la carnitina está en su forma libre en el plasma a concentraciones de aproximadamente 40-50 $\mu\text{M/L}$ (Hoppel 2003).

2.6.1 β -oxidación

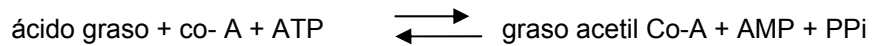
La β -oxidación se produce en tres fases: en la primera, los ácidos grasos sufren la eliminación oxidativa de unidades sucesivas de dos átomos de carbono en forma de acetil co-A a partir del extremo carboxilo de la cadena del ácido graso; en la segunda fase, los grupos acetilo del acetil-coA se oxidan a CO_2 a través del ciclo de Krebs, que también tiene lugar en la matriz mitocondrial. El acetil- coA procedente de la oxidación de ácidos grasos entra de éste modo en una ruta oxidativa final común junto con acetil-coA procedente de la glucosa, vía glucólisis y oxidación del piruvato.

Cuatro reacciones catalizadas por enzimas constituyen la primera fase de oxidación de ácidos grasos. En primer lugar, la deshidrogenación del acil graso coA genera un doble enlace entre los átomos de carbono α y β (C2 y C3), dando lugar a un $\text{trans-}\Delta^2$ enoil- co-A; éste paso está catalizado por tres isozimas de la acil co-A deshidrogenasa, cada uno específico para un intervalo de longitudes de la cadena del ácido graso, los electrones eliminados del acil graso-CoA son transferidos al FAD.

En el segundo paso de la β -oxidación, se adiciona agua al doble enlace del $\text{trans-}\Delta^2$ enoil- CoA para formar el estereoisómero L del β -hidroxiacil-coA, ésta reacción es catalizada por la enoil co-A hidratasa y es formalmente análoga a la reacción de la fumarasa del ciclo de Krebs, en la que se adiciona H_2O a un doble enlace α - β . En el tercer paso, se deshidrogena el L- β - hidroxiacil-co-A para formar β -cetoacil-CoA por acción de la β -hidroxiacil-co-A deshidrogenasa, donde el NAD^+ es el aceptor de electrones. Finalmente el cuarto paso es catalizado por la acil-CoA acetiltransferasa, más comúnmente llamada tiolasa, que promueve la reacción entre el β -cetoacil-CoA y una molécula de coenzima A libre para dar lugar a la separación del fragmento carboxilo-terminal de dos carbonos de la cadena original del ácido graso en forma de acetil-CoA.

Parte de las enzimas de la oxidación de los ácidos grasos en las células animales se localizan en la matriz mitocondrial, como demostraron Kennedy y Lehninger en 1948. Los ácidos grasos con longitudes de cadena de 12 o menos carbonos entran en la mitocondria sin ayuda de transportadores de membrana; sin embargo, aquellos con 14 o más carbonos, que

constituyen la mayoría de los ácidos grasos libres obtenidos en la dieta o liberados del tejido adiposo, no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales, sin antes haber pasado por tres reacciones enzimáticas del acarreador de la carnitina. La primera de ellas está catalizada por una familia de isozimas (diferentes isoenzimas para ácidos grasos con cadenas carbonadas cortas, intermedias o largas) presentes en la membrana mitocondrial externa, las acil-co-A sintetetasas, que llevan a cabo la siguiente reacción general:



Así, las graso acil-CoA sintetetasas catalizan la formación de un enlace tioéster entre el grupo carboxilo del ácido graso y el grupo tiol de la CoA para generar un acil graso CoA. La reacción tiene lugar en dos pasos y da lugar a la formación de un intermediario acil graso adenilato. Los ésteres del graso acil Co-A formados en el lado citosólico de la membrana mitocondrial externa pueden ser transportados al interior de la mitocondria y oxidados para producir ATP, o pueden utilizarse en el citosol para sintetizar lípidos de membrana.

Los ácidos grasos destinados a la oxidación mitocondrial se unen transitoriamente al grupo hidroxilo de la carnitina para formar acetil-carnitina, que es la segunda reacción del acarreador. Esta transesterificación es catalizada por la carnitina aciltransferasa I de la membrana externa. El graso acil Co-A pasa a través de la membrana externa y se convierte en éster de carnitina en el espacio intermembranal, o bien el éster de carnitina se forma en el lado citosólico de la membrana externa y es transportado al espacio intermembranal.

Posteriormente, el éster acetil graso-carnitina penetra a la matriz mitocondrial por difusión facilitada mediante el transportador de acetil-carnitina/carnitina de la membrana mitocondrial interna. En el tercer y último paso del acarreador de carnitina, el grupo acilo graso es transferido enzimáticamente desde la carnitina a la CoA intramitocondrial por la carnitina acil transferasa II; ésta isoenzima, localizada en la cara interna de la membrana mitocondrial, regenera el acil graso coA y lo libera, junto con la carnitina libre, al interior de la matriz (Figura 9.) La carnitina vuelve a penetrar en el espacio intermembranal mediante el transportador de acil-carnitina/carnitina (Lehninger 2005).

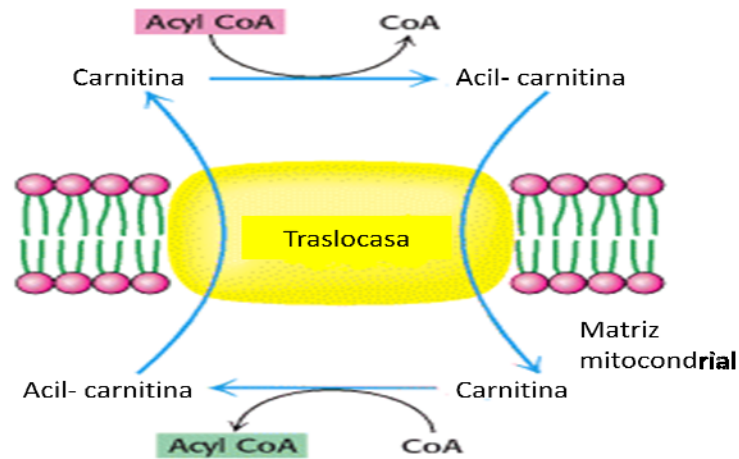


Figura 9. Traslocación del acil graso al interior de la mitocondria.

2.6.2 Efecto protector de la L-CAR

La L-carnitina y sus ésteres acilo tienen un rol importante como transportadores en el metabolismo energético en la mitocondria durante la β -oxidación de los ácidos grasos. Además, estudios recientes han mostrado que la acetil-L-carnitina, uno de los ésteres acilo de cadena corta, hace que las ratas viejas recuperen la capacidad de aprendizaje (Ando, Tadenuma et al. 2001), y disminuye el daño neuronal que se observa después de eventos de isquemia y reperfusión (Calvani & Arrigoni-Martelli 1999).

A pesar del bajo nivel de β -oxidación en el cerebro, la L-carnitina se transporta activamente a través de la barrera hematoencefálica y se acumula en las células neuronales (Mroczkowska, Galla et al. 1997). Como se ha hipotetizado, el principal rol modulador de la L-carnitina en la función neuronal podría ser a través de la transferencia de grupos acetilos para la síntesis de acetilcolina, así como la influencia en señales de transducción y expresión génica (Binienda & Ali 2001). Sin embargo, también se ha observado que la L-CAR previene el estrés oxidante y regula al NO^* , la respiración celular (Brown 1999) y la actividad de enzimas involucradas en la defensa contra el daño oxidante como la GSH (Kremser, Stangl et al. 1995). También se le ha atribuido este rol antioxidante debido a que se ha demostrado que previene la acumulación de los productos de la lipoperoxidación (Lowitt, Malone et al. 1995).

Por otro lado, sus ésteres también tienen la capacidad de inhibir parcialmente la peroxidación lipídica inducida por hierro en liposomas, esto al formar complejos con el hierro libre, por lo que la reducción en la peroxidación lipídica puede deberse a la capacidad quelante de hierro que esta molécula tiene (Arduini 1992). Se ha reportado que los compuestos con estructuras que contienen uno o más de los siguientes grupos funcionales: $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{S}-$ y $-\text{O}-$ en una configuración favorable para la estructura-función, pueden mostrar actividad de quelante de metales (Yuan et al., 2005). La capacidad quelante de la L-CAR es

dosis-dependiente, ya que presenta un 98.9% de actividad quelante de iones ferrosos a una concentración de 30 µg/mL (Gulcin et al., 2006). Existe evidencia que enfatiza la importancia de la L-CAR, ya que después del tratamiento con la molécula, las ratas seniles presentan niveles elevados de SOD, sugiriendo así que el aumento de SOD puede deberse a los efectos antiradicales de la carnitina y su papel antioxidante como quelante de metales (Muthuswamy, Vedagiri et al. 2006). Es por esto que la L-CAR se ha considerado como una de las moléculas neuroprotectoras más utilizadas para la investigación.

2.7 S-alilcisteína

La utilización médica del ajo (*Allium sativum*) tiene una larga historia (Block 1985) ya que contiene compuestos organosulfurados únicos, los cuales le confieren su sabor, olor y la mayoría de sus propiedades biológicas. Particularmente, la S-alilcisteína (SAC), una de las moléculas organosulfuradas más abundantes en los extractos de ajo envejecido, ejerce efectos antioxidantes a través de su capacidad de atrapar ERO (Kim, Chun et al. 2001), reduciendo así el estrés oxidante. Se ha reportado que los componentes que contienen tioles encontrados en el ajo (Haugaard, Lee et al. 1969; Forman, Rotman et al. 1983), como la SAC, ejercen acciones antioxidantes debido a que éstos previenen la peroxidación de lípidos (Lewin & Popov 1994).

2.7.1 Efectos protectores de la S- alilcisteína

Entre las acciones positivas que presenta la SAC en el sistema nervioso central se encuentran la reducción de la formación del edema en cerebro de ratas con isquemia a través de la inhibición de la peroxidación (Numagami & Ohnishi 2001), la inducción de acciones neurotróficas en cultivos de neuronas hipocampales de rata (Moriguchi, Matsuura et al. 1997), la disminución de la toxicidad hipocampal inducida por el péptido β-amiloide (Perez-Severiano, Rodriguez-Perez et al. 2004) y la neuroprotección contra la excitotoxicidad y el daño oxidante inducidos por el QUIN en el estriado de rata (Perez-Severiano, Salvatierra-Sanchez et al. 2004). Además, se ha observado que éste compuesto es capaz de prevenir las alteraciones tempranas en la actividad de la SOD y en la capacidad reductora de la mitocondria producida por el 3-NP en el núcleo caudado de rata, y también reduce el comportamiento hiperkinético producido por la micotoxina (Herrera-Mundo, Silva-Adaya et al. 2006).

La SAC es capaz de inhibir efectivamente la activación del NF-κB por H₂O₂ (Geng, Rong et al. 1997) y regular la producción de NO• a través de la inhibición de la expresión de la SON en macrófagos. Por otro lado, éste compuesto presenta efectos anti-apoptóticos en daño inducido por cromo a través de la activación del factor Nrf2 en hepatocitos. También disminuye de manera significativa el daño oxidante producido por un modelo que combina excitotoxicidad y déficit energético aún en condiciones de ausencia de Ca²⁺ extracelular, sugiriendo así que éste agente no es solo un potente antioxidante en preparaciones tisulares nerviosas que involucran eventos de excitotoxicidad inducida por Ca²⁺, sino que también puede ser un agente anti-excitotóxico que conserve el estado energético por sí mismo (Perez-De La Cruz, Konigsberg et al. 2008). Tomando en cuenta estas propiedades antioxidantes, la SAC se

constituye como un agente prometedor que disminuye la toxicidad en modelos animales y en enfermedades neurodegenerativas.

Por todo lo anterior, y en consideración de la evidente falta de estudios sobre las capacidades antioxidantes y neuroprotectoras de estos agentes como post-tratamientos en modelos neurotóxicos, en el presente estudio probamos los efectos de ambos antioxidantes sobre el daño oxidante y el déficit energético inducidos por dos conocidas neurotoxinas en terminales nerviosas aisladas, con la finalidad de obtener información sobre el curso temporal de protección y “rescate” posterior al daño neuronal.

3. JUSTIFICACIÓN

- Debido a que las enfermedades neurodegenerativas presentan componentes excitotóxicos y de déficit energético, queremos observar si ciertas moléculas como la SAC y la L-CAR funcionan como post- tratamiento en modelos que recrean éstos eventos (QUIN y 3NP).

4. HIPÓTESIS

- La administración L-CAR y SAC como post-tratamiento en las fracciones sinaptosomales incubadas en presencia de las neurotoxinas que producen los diferentes modelos neurotóxicos producirá niveles variables de protección sobre los marcadores de daño oxidante y funcionalidad mitocondrial reflejados en el tiempo.

5. OBJETIVO

- Probar si las dos moléculas neuroprotectoras utilizadas (L-CAR y SAC) son capaces de recuperar la funcionalidad mitocondrial y disminuir la peroxidación lipídica después de 1, 3 y 6 h de que se generó el insulto tóxico en tres modelos de daño neuronal: (1) un modelo pro-oxidante y excitotóxico evocado por el QUIN, (2) un modelo de déficit energético producido por el 3-NP, y (3) un modelo sinérgico generado por la administración de ambas toxinas (3NP + QUIN) en dosis subtóxicas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Materiales

El 3-NP, el QUIN y el MTT fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los otros reactivos fueron de la más alta pureza disponible y se consiguieron de otras marcas comerciales. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada obtenida de un sistema de purificación Milli-RQ (Millipore, Bedford, MA, USA).

6.2 Obtención e incubación de fracciones sinaptosomales

Las fracciones sinaptosomales se obtuvieron de cerebros completos de ratas Wistar macho de entre 270- 300 g , según estudios previos (Perez-De La Cruz, Gonzalez-Cortes et al. 2005). Los animales fueron decapitados y rápidamente se extrajo el cerebro y se homogenizó en 10 volúmenes (v/w) de 0.32 mol/L de sacarosa. Los homogenizados se centrifugaron a 1073 xg por 10 minutos y el sobrenadante resultante fue recentrifugado a 17, 172 xg por 15 minutos. Los pellets fueron resuspendidos en buffer HEPES ((0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L NaH₂PO₄, 0.05 mol/L NaHCO₃, 0.01 mol/L CaCl₂, 0.006 mol/L glucosa, y 0.01 mol/L HEPES, pH 7.4), y empleados de inmediato para los experimentos.

Se utilizaron alícuotas de 250 µL para la cuantificación de peroxidación lipídica y de 500 µL para la funcionalidad mitocondrial. Las muestras se incubaron en un baño con agitación constante por 60, 180 y 360 minutos (cada una correspondiendo a una serie de grupos diferentes), en presencia de las toxinas por separado o combinadas, en concentraciones subtóxicas de QUIN (21.03 µmol/L) y 3-NP (166.6 µmol/L), o por separado en concentraciones tóxicas (100 µmol/L QUIN y 1 mmol/L 3-NP).

6.3 Post- tratamiento con L-CAR y SAC

Pasando la incubación con las toxinas, se adicionaron concentraciones variables (10-1000 µmol /L) de L-CAR y SAC por 30 minutos, para finalmente medir la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial al término de las incubaciones.

6. 4 Peroxidación de lípidos (PL) *in vitro*

La peroxidación de lípidos se midió en fracciones sinaptosomales por medio de la cuantificación de sustancias que reaccionaron con el TBA. Se tomaron 250 µL de alícuotas con fracciones sinaptosomales que previamente fueron expuestas a los diferentes tratamientos y se les agregó 500 µL del reactivo TBA (0.38 g de TBA+ 15 g de ácido tricloroacético + 2.5 mL de HCl) para ser incubadas a 94°C por 20 minutos en baño maría. Durante la incubación, las muestras adquieren un color rosa que está relacionado directamente con la cantidad de

productos de la peroxidación. Al término de la incubación los tubos fueron enfriados por 5 minutos en hielo y luego se centrifugaron a 3, 000 xg por 15 minutos. Finalmente, la densidad óptica de los sobrenadantes de las muestras se midió a 532 nm en un Espectrofotómetro Génesis 8 (Cole-Parmer, Veron-Hills, IL. USA).

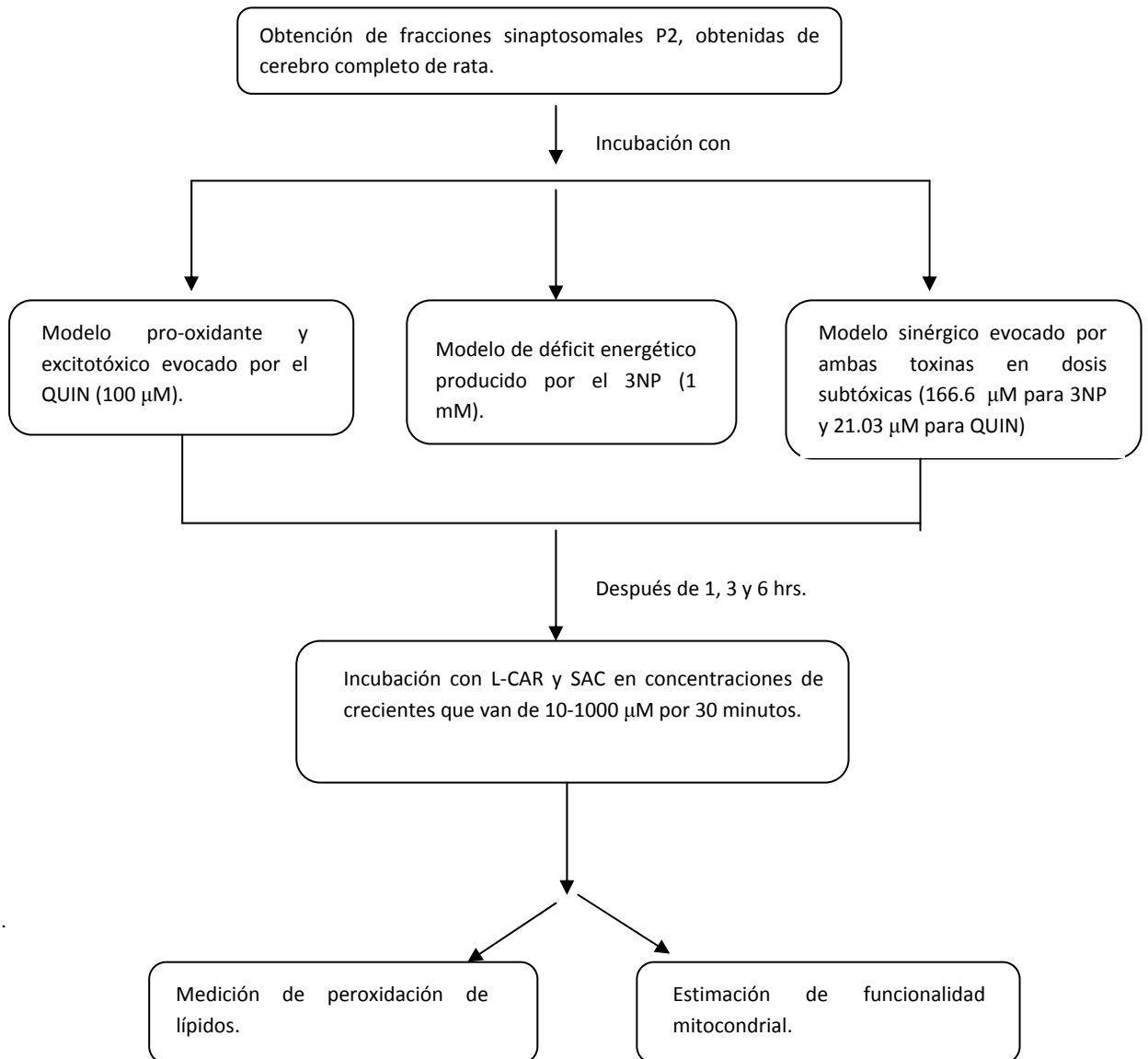
6. 5 Estimación de la función mitocondrial en fracciones sinaptosomales

La función mitocondrial fue evaluada en fracciones sinaptosomales por medio del ensayo de la reducción de MTT y de acuerdo con estudios previos (Pérez-De la Cruz, 2005). Las fracciones (500 μ L) se incubaron previamente con las neurotoxinas y en presencia de los fármacos (QUIN y/o 3-NP), y al finalizar la incubación se agregaron 10 μ L de una solución de MTT (5 mg/mL) que fueron incubadas por 20 minutos, posteriormente las muestras se centrifugaron a 15,300 g por 15 minutos . Finalmente, el medio se removió y el formazán precipitado fue resuspendido con 750 μ L de isopropanol ácido; la producción de formazán se cuantificó a 570 nm en un Espectrofotómetro Génesis 8 (Cole-Parmer, Veron-Hills, IL. USA).

6.6 Análisis estadístico

Los resultados están expresados como promedios \pm un SEM. Las diferencias entre grupos de todos los experimentos fueron analizadas por ANOVA de una vía seguida por una prueba de Tukey para comparaciones múltiples (GraphPad Prism 5.0). Los niveles de significancia fueron establecidos a $P < 0.05$.

6.7 Diagrama de Flujo

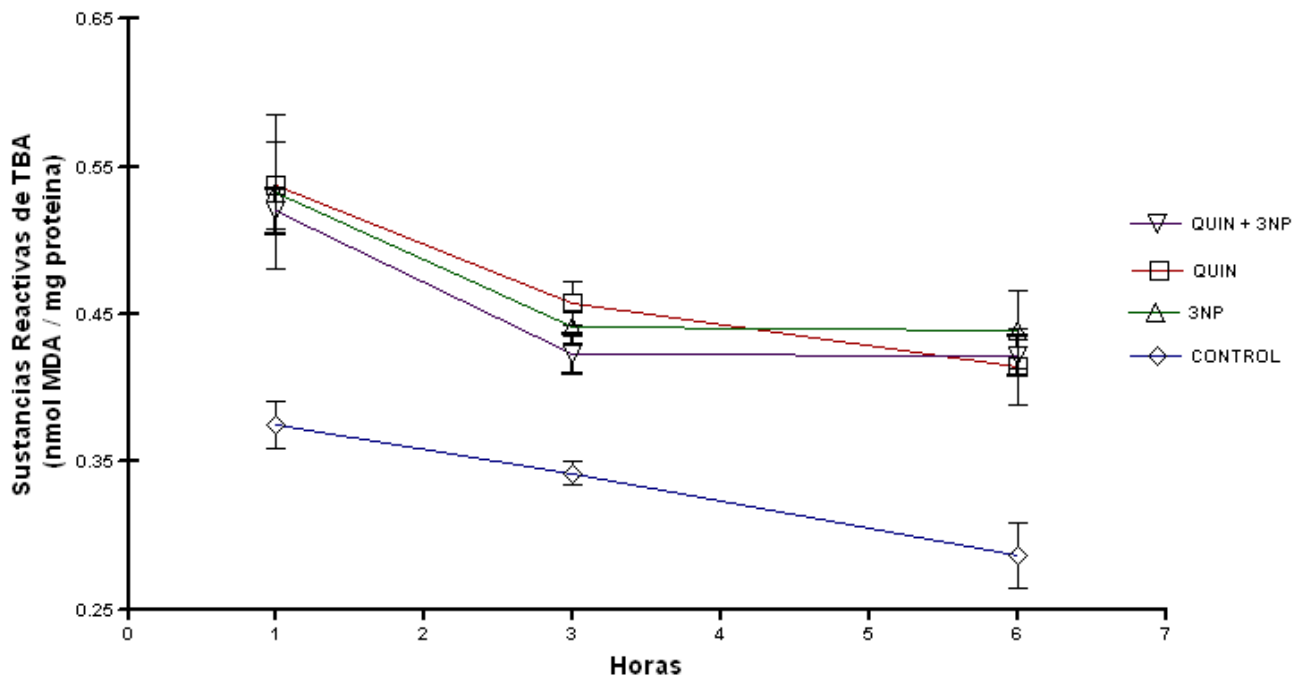


7. RESULTADOS

7.1 Efecto del QUIN y/o el 3-NP sobre la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial después de 1, 3 y 6 h.

La Figura 10a muestra el efecto de las toxinas sobre la peroxidación lipídica a los tres tiempos estudiados (1, 3 y 6 h). Se observa que en los tres modelos se alcanza el máximo valor de peroxidación 1 hora después de la incubación (QUIN 43%, 3-NP 42% y QUIN + 3-NP 38.5% con respecto al grupo Control). En la Figura 10b se muestra los efecto sobre la funcionalidad mitocondrial en los tres tiempos probados, siendo también 1 h después de la incubación cuando se alcanzan los menores valores de funcionalidad mitocondrial (QUIN 60%, 3NP 49% y QUIN+ 3NP 66% por debajo del grupo Control).

(a)



(b)

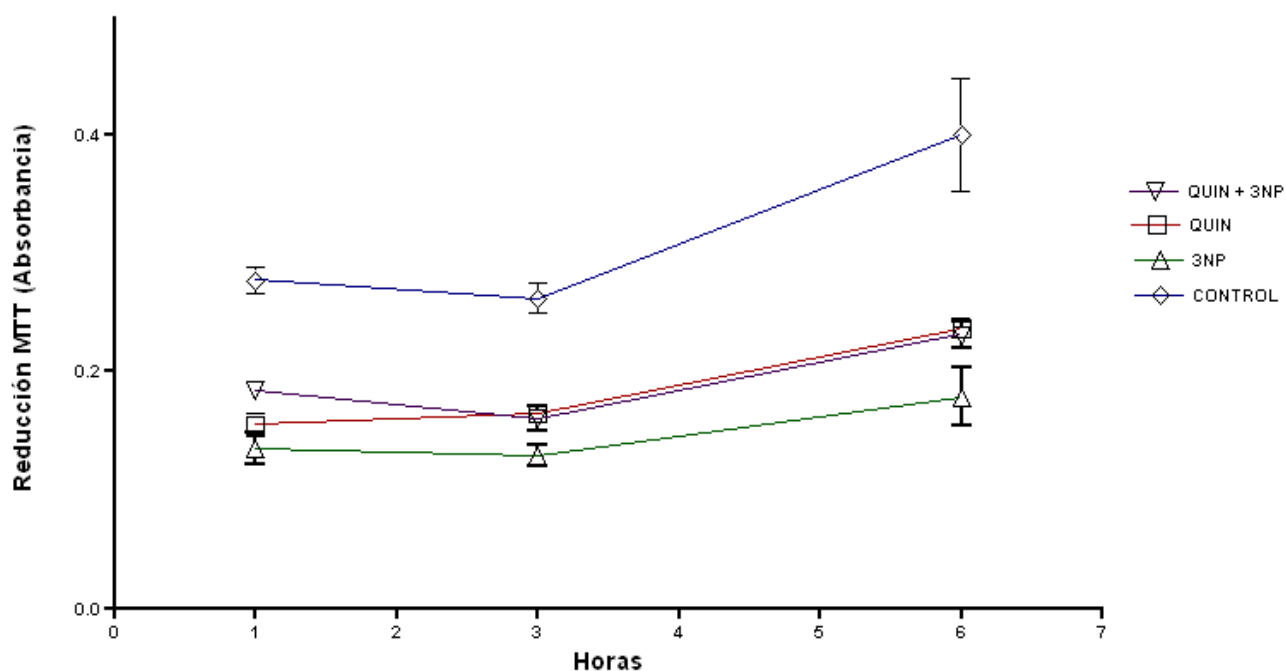


Figura 10. Efecto del QUIN (100 μ M), el 3NP (1 mM) y el QUIN + 3NP (21.03 μ M y 166.6 μ M, respectivamente) en la peroxidación lipídica (a) y en la funcionalidad mitocondrial (b), después de 1, 3 y 6 h. Todos los datos fueron estadísticamente diferentes del grupo Control ($p < 0.001$). Se utilizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey. Los resultados están expresados como promedios \pm un SEM.

7.2 Efecto de la L-CAR como post-tratamiento

7.2.1 La peroxidación de lípidos es abatida completamente por la L-CAR después de 1 h de exposición en un modelo sinérgico evocado por la administración de QUIN + 3-NP.

Se observa que la L-CAR como post-tratamiento (1 hora después) abate por completo la peroxidación lipídica en un modelo sinérgico evocado por el QUIN + 3-NP (Figura 11); sin embargo, no hay protección 3 o 6 h después (datos no mostrados). Todas las concentraciones probadas (10 - 1000 μ M) disminuyeron la peroxidación de lípidos, incluso por debajo del grupo Control, alcanzando el mejor efecto en 100 μ M y 500 μ M (47.31 % y 45 % por debajo del control de QUIN + 3-NP). Estos resultados sugieren que en el modelo sinérgico, la L-CAR es capaz de reducir la peroxidación lipídica poco tiempo después de que el insulto tóxico ha comenzado.

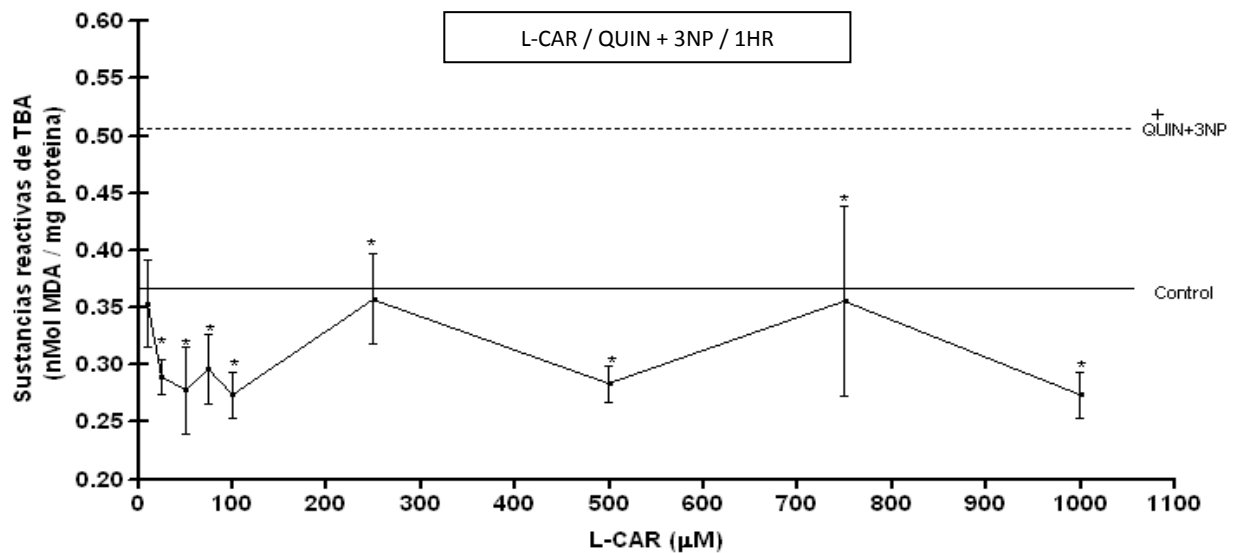
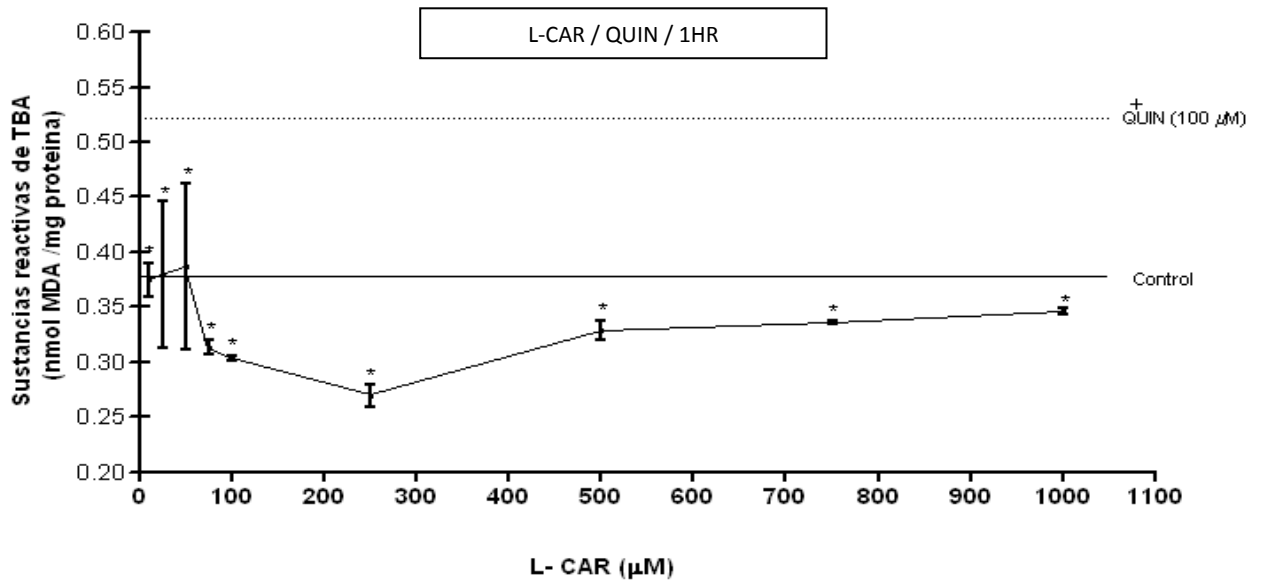


Figura 11. Efecto de la L-CAR como post-tratamiento en la peroxidación de lípidos 1 hora después en un modelo sinérgico evocado por QUIN + 3-NP (21.03 μM y 166.6 μM , respectivamente). +Datos estadísticamente diferentes del grupo QUIN + 3-NP ($p < 0.05$). + Estadísticamente diferente del grupo Control ($p < 0.001$). Se utilizó ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

7.2.2 La peroxidación de lípidos es atenuada cuando la L-CAR se administra 1h después y la funcionalidad mitocondrial se recupera 3 h después de la exposición al QUIN.

La L-CAR disminuyó la peroxidación de lípidos 1 h después de la exposición al QUIN (100 μM) (Figura 12a); sin embargo, 3 y 6 h de incubación tóxica, la L-CAR no fue capaz de revertir los efectos tóxicos del QUIN (datos no mostrados). Se observa que las concentraciones utilizadas (10 – 1000 μM) revierten por completo la peroxidación, siendo 250 μM la concentración que mostró el mayor efecto (50 % por debajo del valor de QUIN). Por otro lado, L-CAR recuperó la funcionalidad mitocondrial en concentraciones que van desde 75 y hasta 500 μM después de 3 h de incubación tóxica con QUIN (100 μM) (Figura 12b). Se observó que la concentración de 100 μM es la que muestra el máximo efecto (95 % por arriba del valor de QUIN). Los resultados sugieren que en el modelo excitotóxico y pro-oxidante evocado por el QUIN, la peroxidación de lípidos ocurre en las primeras h después del insulto tóxico y que la disfunción mitocondrial es secundaria a este evento, por lo que la L-CAR puede estar protegiendo en dos distintos tiempos en el mismo modelo.

(a)



(b)

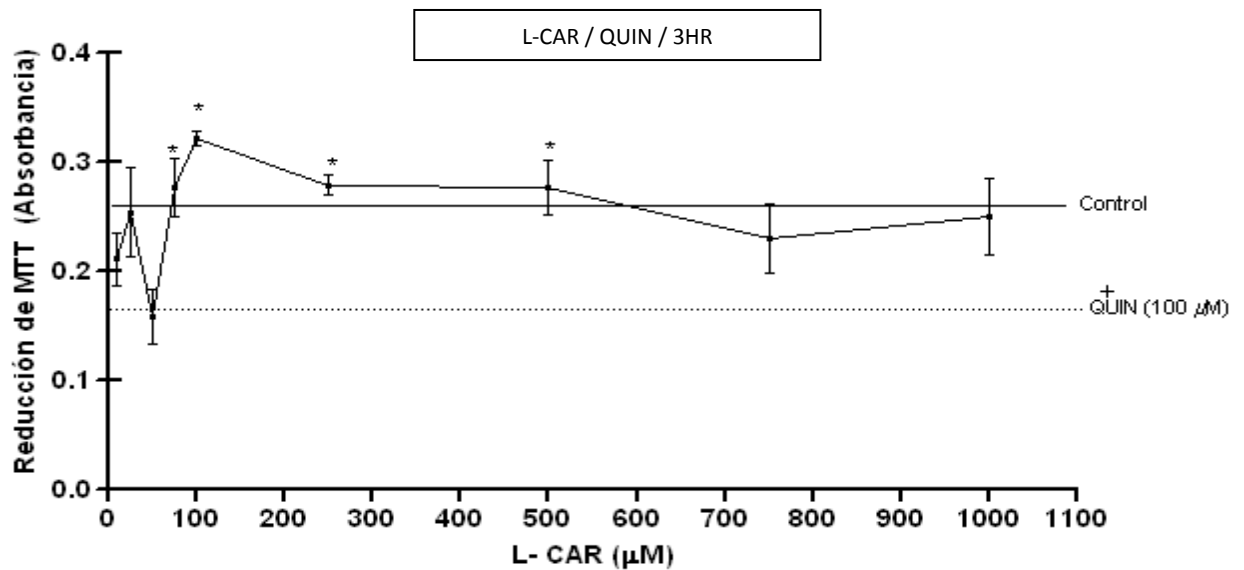


Figura 12. Efecto protector de la L-CAR como post-tratamiento sobre la peroxidación de lípidos (a) y la funcionalidad mitocondrial (b), a 1 y 3 h después de la incubación tóxica (respectivamente), en un modelo excitotóxico y pro-oxidante evocado por QUIN ($100\mu\text{M}$).

*Datos estadísticamente diferentes del QUIN ($p < 0.05$). +Estadísticamente diferente del grupo Control ($p < 0.001$). Se utilizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey. En el caso de la funcionalidad mitocondrial los resultados están expresados como promedios \pm un SEM

7.2.3 La L-CAR atenuó la disfunción mitocondrial evocada 3 h después de la exposición al 3-NP (Modelo de déficit energético)

En cuanto a la funcionalidad mitocondrial, se observó que la L-CAR recuperó éste parámetro hasta 3 h después del insulto tóxico evocado por el 3-NP (1 mM) (Figura 13), mostrando así efectos en un tiempo más largo y actuando en todas las concentraciones evaluadas, siendo la de 500 μM la que ejerció mayor efecto (95 % por encima del valor de 3-NP). Ya que éste modelo está dirigido al bloqueo de la cadena mitocondrial, podríamos pensar que a una hora de incubación con la toxina, la L-CAR aún no es capaz de activar mecanismos de defensa o disminuir ERO para revertir el daño; sin embargo, los resultados sugieren que a las 3 h es capaz de aumentar la funcionalidad mitocondrial en todas las concentraciones utilizadas.

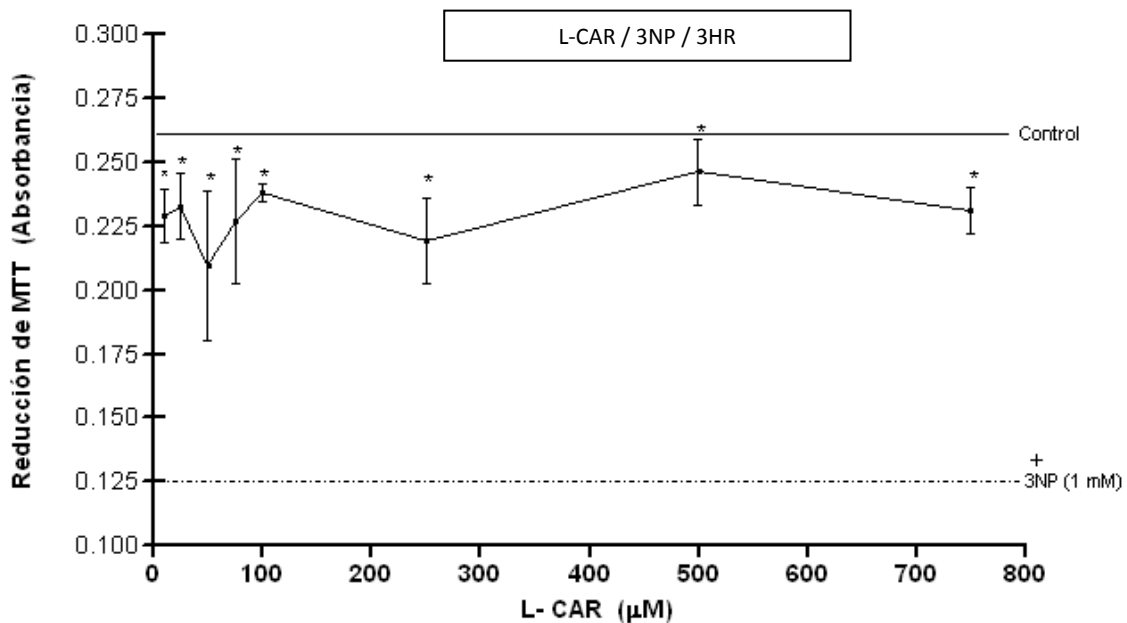
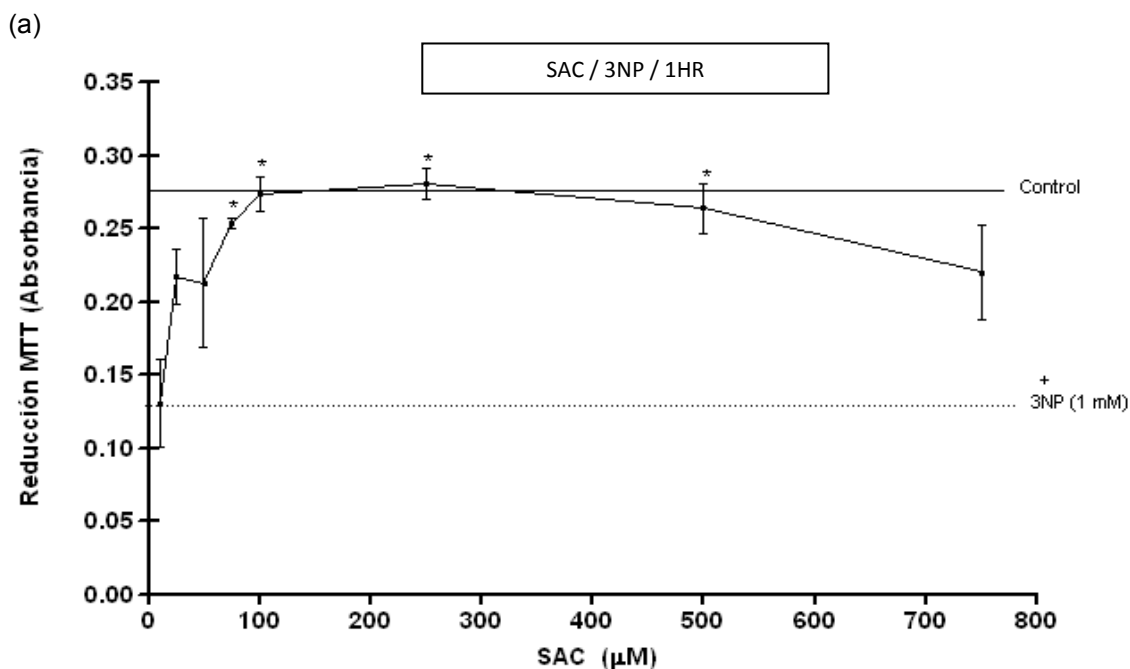


Figura 13. Efectos sobre la funcionalidad mitocondrial de la L-CAR como post-tratamiento (3 h después) en un modelo de déficit energético producido por el 3-NP (1 mM). *Datos estadísticamente diferentes del grupo 3-NP ($p < 0.05$). +Estadísticamente diferente del grupo Control ($p < 0.001$). Se utilizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey. En el caso de la funcionalidad mitocondrial los resultados están expresados como promedios +/- un SEM

7.3 Efectos de la SAC como post-tratamiento

7.3.1 La SAC recobró la funcionalidad mitocondrial 1 y 3 h después de la incubación tóxica en un modelo de déficit energético producido por el 3-NP

La SAC como post-tratamiento recuperó la funcionalidad mitocondrial a 1 y 3 h después de la incubación tóxica en un modelo de déficit energético producido por el 3-NP (1 mM) (Figura 14), pero no presentó efectos a las 6 h (datos no mostrados). El efecto de la SAC a una hora de incubación se observó principalmente en las concentraciones que van desde 75 y hasta 500 μM , siendo la de 250 μM la que alcanzó el efecto máximo (98 % por encima del valor de 3-NP), incluso por arriba del grupo Control (Figura 14a). Por otro lado, el SAC también restableció la funcionalidad mitocondrial después de 3 h de la incubación con la toxina (Figura 14b). En la gráfica muestra que las concentraciones utilizadas se encuentran al nivel o por encima del valor del grupo Control, siendo la de 250 μM la que alcanza mayores efectos (98 % por encima del valor de 3-NP). Los datos sugieren que en éste modelo el estrés oxidante tiene un papel muy importante, ya que las capacidad antioxidante de la SAC revierte la disfunción mitocondrial que ocurre a 1 y 3 h después de la administración de la toxina.



(b)

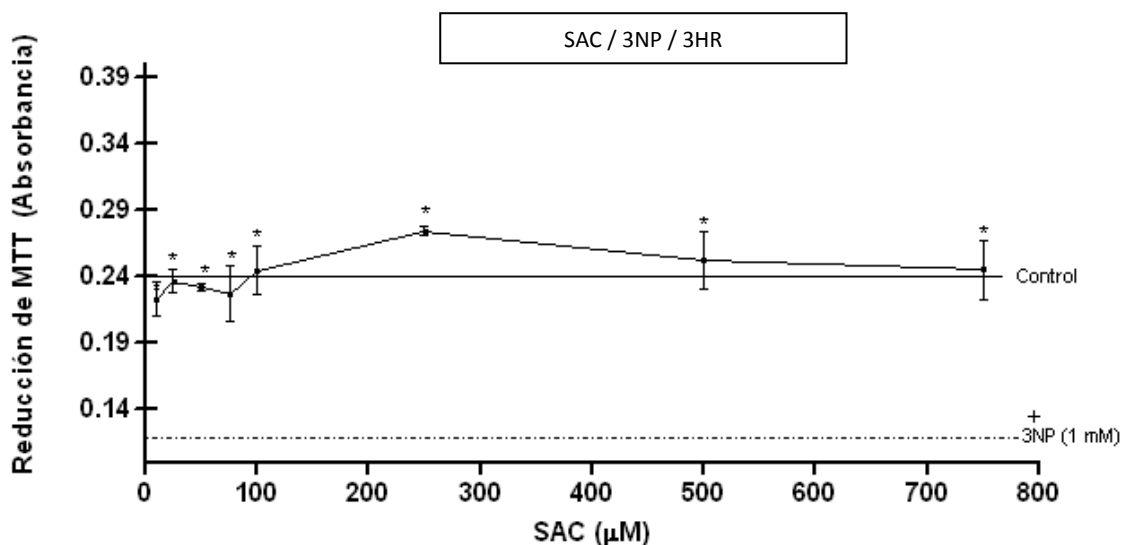


Figura 14. Efecto de la SAC como post-tratamiento sobre la funcionalidad mitocondrial a 1 (a) y 3 h después (b) de la incubación tóxica con 3-NP (1 mM). *Datos estadísticamente diferentes del grupo 3-NP ($p < 0.05$). +Estadísticamente diferente del grupo Control ($p < 0.001$). Se utilizó ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. Los resultados están expresados como promedios \pm un SEM.

7.3.2 La disfunción mitocondrial evocada durante 3 h de exposición a QUIN es atenuada por SAC

En el modelo evocado por el QUIN (100 μ M), el SAC aumentó la funcionalidad mitocondrial a 3 h después del insulto tóxico (Figura 15). Se observó que todas las concentraciones probadas (10 – 1000 μ M) generaron un efecto por encima del valor del grupo Control; sin embargo, a la concentración de 50 μ M se obtuvieron los valores más elevados de funcionalidad mitocondrial (98% por encima del valor de QUIN). Los resultados sugieren que, al igual que con la L-CAR, la SAC es capaz de recuperar la funcionalidad mitocondrial 3 h después, esto sugiere que además de su efecto antioxidante, la SAC podría haber activado otras vías (expresión génica o antioxidantes endógenos) que lleven al restablecimiento de la funcionalidad celular.

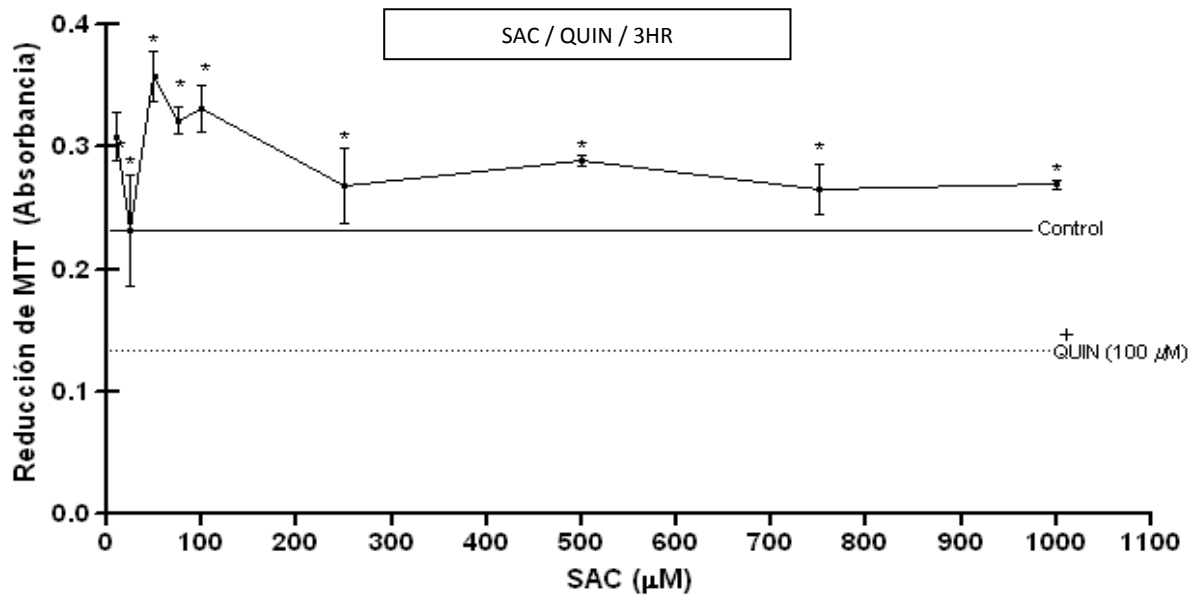


Figura 15. Efecto de la SAC sobre la funcionalidad mitocondrial 3 h después de la incubación tóxica con QUIN (100 μ M). *Datos estadísticamente diferentes del grupo QUIN ($p < 0.05$). +Estadísticamente diferente del grupo Control ($p < 0.001$). Se utilizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey. Los resultados están expresados como promedios \pm un SEM

8. Discusión

La excitotoxicidad, el déficit energético y el estrés oxidante son procesos importantes que llevan a la muerte celular en diversas patologías. En este trabajo se recrearon eventos tóxicos al administrar QUIN (100 μ M), 3-NP (1 mM) y QUIN + 3-NP como modelos de daño. Los resultados muestran que estos eventos ocurren durante las primeras horas posteriores a la exposición con las toxinas, lo que es relevante ya que significa que con diversos fármacos posiblemente se pueda rescatar a la célula antes de que se llegue a la muerte.

Las moléculas probadas como post-tratamientos (L-CAR y SAC) revierten el efecto que las toxinas ejercen sobre la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial en tiempos cortos (1 y 3 h después de la incubación), sugiriendo así que una administración crónica de la L-CAR o la SAC podría alargar el efecto benéfico; sin embargo, esta hipótesis requiere de mayores estudios.

La L-CAR restableció los dos parámetros probados (MTT y LP) a 1 y 3 h después de la incubación con QUIN, revirtió la peroxidación de lípidos 1 hora después en el modelo con QUIN + 3-NP y recuperó la funcionalidad mitocondrial 3 h después en el modelo con 3-NP; sin embargo, la SAC únicamente revirtió los efectos sobre la disfunción mitocondrial a 1 y 3 h después en el modelo de 3-NP y 3 h después en el modelo evocado por el QUIN. El hecho de que las dos moléculas restablecieran los parámetros usados en tiempos cortos sugiere que es en estos tiempos en los que la célula se encuentra en un estado de "resistencia", intentando sobrevivir al insulto tóxico.

En el caso de la L-CAR, el efecto protector que mostró como post-tratamiento en los modelos estudiados podría deberse en su mayoría a las propiedades antirradicales y a su rol como antioxidante, mismos que ya han sido descritos en estudios previos (Rani & Panneerselvam 2001; Muthuswamy, Vedagiri et al. 2006). La reducción de la peroxidación en el modelo con QUIN y QUIN + 3-NP podría deberse a que previene la acumulación de los productos de la lipoperoxidación (Lowitt, Malone et al. 1995), además se ha reportado que sus ésteres son capaces de inhibir parcialmente la peroxidación lipídica inducida por hierro en liposomas al formar complejos con el hierro libre, por lo que la reducción en la peroxidación lipídica puede deberse a la capacidad quelante sobre el metal que este agente posee (Arduini 1992). Aunado a esto, la acetil-L-carnitina (ALCAR), un metabolito de la L-CAR, previene la reducción de los niveles de la SOD y de la GSH-Px ocasionados por estímulos tóxicos como la radiación. El aumento en los niveles de GSH y de la actividad de la SOD y la GSH-Px sugiere que la protección por ALCAR puede estar mediada por la modulación de los niveles antioxidantes (Mansour 2006), lo cual es de gran relevancia ya que al mantener o aumentar los niveles de sistemas antioxidantes endógenos, la célula es capaz de disminuir las ERO y las ERN, que al parecer son uno de los eventos tóxicos principales en los modelos estudiados. Por otro lado, estos metabolitos (ALCAR y L-CAR) promueven la sobrevivencia neuronal en varias regiones del cerebro, sugiriendo que éstos compuestos mimetizan la actividad de factores

neurotróficos. Por ejemplo, se ha demostrado que la ALCAR produce respuestas del NGF en células PC12 (Tagliatela, Angelucci et al. 1991). A pesar de que éstas moléculas cruzan la membrana celular, también actúan fuera de la membrana; además, ALCAR previene la muerte celular inducida por el NMDA (Forloni, Angeretti et al. 1994) y restablece la recaptura del glutamato (Ishii, Shimpo et al. 2000).

Otro efecto que ha mostrado la ALCAR es el de restablecer los niveles de cardiolipina, el cual es un fosfolípido ácido que se produce solo en la mitocondria y es crítico para su funcionamiento (Schlame, Rua et al. 2000). Este lípido contribuye significativamente al potencial transmembranal que dirige la formación de ATP por medio de la ATPsintasa (Paradies & Ruggiero 1991). La reducción de éste lípido está acompañada de una producción alta de radicales libres en la mitocondria y bajos niveles de enzimas antioxidantes (Hoch 1992). Entonces, una posibilidad por la cual se esté restableciendo la funcionalidad mitocondrial es que al estar restaurando los lípidos mitocondriales, la disfuncionalidad ocasionada por los insultos tóxicos disminuya y se pueda llegar a un funcionamiento mitocondrial adecuado.

En cuanto al efecto protector que mostró la SAC sobre la funcionalidad mitocondrial, podría deberse a que es capaz de prevenir las alteraciones tempranas que ocurren sobre la actividad de la SOD y la capacidad reductora de la mitocondria producida por el 3-NP. Además de éstas propiedades, se ha demostrado que la SAC reduce el comportamiento hipercinético inducido por el 3-NP, sugiriendo así que la excitotoxicidad primaria y los eventos oxidantes evocados por esta toxina durante las primeras etapas de la toxicidad están altamente relacionadas. Es por eso que se cree que en este modelo, las acciones de prevención ejercidas por la SAC pueden ser atribuibles a su habilidad de preservar el estado redox de la célula a través de su capacidad antioxidante (Perez-Severiano, Rodriguez-Perez et al. 2004; Perez-Severiano, Salvatierra-Sanchez et al. 2004), lo cual podría explicar al porque la SAC ejerce mayor efecto como post-tratamiento en el modelo evocado por el 3-NP, que llevaría eventualmente a un funcionamiento neuronal óptimo necesario para la sobrevivencia.

Además de éstos efectos, se ha reportado que la SAC inhibe la activación del factor NF- κ B inducida por el peróxido de hidrógeno (García, Limón et al. 2008) y regula la producción de NO• al inhibir la expresión de la SON en macrófagos (Kim, Chun et al. 2001). Algunos otros de los alcances que tiene la SAC sobre el Sistema Nervioso Central son la reducción de la formación de edema en cerebro de ratas con isquemia a través de la inhibición de la PL (Numagami & Ohnishi 2001), la inducción de acciones neurotróficas en cultivos de neuronas hipocámpales de rata (Moriguchi, Matsuura et al. 1997), y la disminución de la toxicidad hipocámpal inducida por el péptido β -amiloide (Ito, Ito et al. 2003; Perez-Severiano, Rodriguez-Perez et al. 2004). A pesar de todos los efectos protectores que se han reportado en la literatura, consideramos que es la capacidad antioxidante de la SAC la que hace que funcione como post-tratamiento en el modelo evocado por el 3-NP y el QUIN, evidenciando así que el estrés oxidante tiene un rol muy importante en dichos modelos.

Al comparar las dos moléculas protectoras utilizadas (L-CAR y SAC), podemos decir que la L-CAR protege mejor que la SAC, ya que funcionó en los tres modelos probados. Una diferencia entre ambos podría ser que la SAC puede estar ejerciendo su efecto a distinto nivel, activando distintas vías de señalización, aunque la razón más obvia en sus diferencias podría tener que ver con que la L-CAR tiene propiedades antioxidantes y pro-energéticas, mientras que la SAC parece ejercer su efecto fundamentalmente a través de su capacidad antioxidante. En cualquier caso, algo relevante de ambos agentes es que son capaces de rescatar a los sinaptosomas de alteraciones metabólicas, sugiriendo así su uso para evitar la neurodegeneración. Es por ello que la L-CAR y la SAC necesitan ser estudiadas con mayor énfasis para elucidar el mecanismo molecular a través del cual están actuando. Finalmente, estas moléculas prometen ser una herramienta importante para el reto farmacológico en los modelos de daño neuronal.

9. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró que sustancias como la L-CAR y la SAC, ambas con propiedades antioxidantes, son capaces de revertir los efectos tóxicos que ejercen moléculas neurotóxicas en sinaptosomas de rata durante las primeras etapas de la cascada tóxica (1 y 3 h), estableciendo éstos tiempos como críticos y aún viables para el rescate celular..

10. PERSPECTIVAS

La investigación realizada es solo una primera aproximación a cómo diversas moléculas neuroprotectoras funcionan como post-tratamientos aún cuando el insulto tóxico ya ha comenzado. Por ello, es de gran importancia seguir haciendo investigaciones con estas moléculas para indagar el mecanismo a nivel celular, bioquímico y molecular por el cual están ejerciendo sus efectos y para el eventual diseño de estrategias terapéuticas que puedan ser empleadas en diversas enfermedades neurodegenerativas.

11. BIBLIOGRAFÍA

Ando, S., T. Tadenuma, et al. (2001). "Enhancement of learning capacity and cholinergic synaptic function by carnitine in aging rats." *J Neurosci Res* 66(2): 266-71.

Arduini, A. (1992). "Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants?" *Am Heart J* 123(6): 1726-7.

Arundine, M. and M. Tymianski (2003). "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity." *Cell Calcium* 34(4-5): 325-37.

Beadle, G. W., H. K. Mitchell, et al. (1947). "Kynurenine as an Intermediate in the Formation of Nicotinic Acid from Tryptophane by Neurospora." *Proc Natl Acad Sci U S A* 33(6): 155-8.

Beal, M. F., E. Brouillet, et al. (1993). "Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid." *J Neurosci* 13(10): 4181-92.

Beal, M. F., R. J. Ferrante, et al. (1995). "3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice." *J Neurochem* 65(2): 919-22.

Beal, M. F., N. W. Kowall, et al. (1986). "Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid." *Nature* 321(6066): 168-71.

Behan, W. M., M. McDonald, et al. (1999). "Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl." *Br J Pharmacol* 128(8): 1754-60.

Binienda, Z. and C. S. Kim (1997). "Increase in levels of total free fatty acids in rat brain regions following 3-nitropropionic acid administration." *Neurosci Lett* 230(3): 199-201.

Binienda, Z. K. and S. F. Ali (2001). "Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity." *Toxicol Lett* 125(1-3): 67-73.

Block, E. (1985). "The chemistry of garlic and onions." *Sci Am* 252(3): 114-9.

Bondy, S. C. and C. P. LeBel (1993). "The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system." *Free Radic Biol Med* 14(6): 633-42.

Bordelon, Y. M., M. F. Chesselet, et al. (1998). "Effects of intrastriatal injection of quinolinic acid on electrical activity and extracellular ion concentrations in rat striatum in vivo." *Neuroscience* 83(2): 459-69.

Bordelon, Y. M., M. F. Chesselet, et al. (1997). "Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum." *J Neurochem* 69(4): 1629-39.

Brouillet, E., F. Conde, et al. (1999). "Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals." *Prog Neurobiol* 59(5): 427-68.

- Brouillet, E., C. Jacquard, et al. (2005). "3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease." *J Neurochem* 95(6): 1521-40.
- Brown, G. C. (1999). "Nitric oxide and mitochondrial respiration." *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 351-69.
- Bruce-Keller, A. J., G. Umberger, et al. (1999). "Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults." *Ann Neurol* 45(1): 8-15.
- Cadenas, E. (1997). "Basic mechanisms of antioxidant activity." *Biofactors* 6(4): 391-7.
- Cadenas, E. and H. Sies (1998). "The lag phase." *Free Radic Res* 28(6): 601-9.
- Calvani, M. and E. Arrigoni-Martelli (1999). "Attenuation by acetyl-L-carnitine of neurological damage and biochemical derangement following brain ischemia and reperfusion." *Int J Tissue React* 21(1): 1-6.
- Carpenedo, R., A. Pittaluga, et al. (2001). "Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release." *Eur J Neurosci* 13(11): 2141-7.
- Carr, A. C., M. R. McCall, et al. (2000). "Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(7): 1716-23.
- Coles, C. J., D. E. Edmondson, et al. (1979). "Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate." *J Biol Chem* 254(12): 5161-7.
- Eastman, C. L. and T. R. Guilarte (1989). "Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line." *Brain Res* 495(2): 225-31.
- Estrada Sanchez, A. M., J. Mejia-Toiber, et al. (2008). "Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease." *Arch Med Res* 39(3): 265-76.
- Forder, J. P. and M. Tymianski (2009). "Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules." *Neuroscience* 158(1): 293-300.
- Forloni, G., N. Angeretti, et al. (1994). "Neuroprotective activity of acetyl-L-carnitine: studies in vitro." *J Neurosci Res* 37(1): 92-6.
- Forman, H. J., E. I. Rotman, et al. (1983). "Roles of selenium and sulfur-containing amino acids in protection against oxygen toxicity." *Lab Invest* 49(2): 148-53.
- Foster, A. C., A. Vezzani, et al. (1984). "Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid." *Neurosci Lett* 48(3): 273-8.

- Garcia, E., D. Limon, et al. (2008). "Lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and neurochemical and behavioural deficits in different neurotoxic models: protective role of S-allylcysteine." *Free Radic Res* 42(10): 892-902.
- Geng, Z., Y. Rong, et al. (1997). "S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells." *Free Radic Biol Med* 23(2): 345-50.
- Goldstein, L. E., M. C. Leopold, et al. (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, J. B., P. S. Hodgkins, et al. (1997). "Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat." *J Neurochem* 69(1): 290-8.
- Graveland, G. A., R. S. Williams, et al. (1985). "Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease." *Science* 227(4688): 770-3.
- Greene, J. G. and J. T. Greenamyre (1996). "Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo." *J Neurochem* 66(2): 637-43.
- Guillemin, G. J., S. J. Kerr, et al. (2001). "Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection." *J Neurochem* 78(4): 842-53.
- Halliwell, B. G., J.M (1999). *Free radicals in biology and medicine*, Oxford university press.
- Haugaard, N., N. H. Lee, et al. (1969). "The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 172(2): 198-204.
- Herrera-Mundo, M. N., D. Silva-Adaya, et al. (2006). "S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction." *Neurosci Res* 56(1): 39-44.
- Hirata, F. and O. Hayaishi (1971). "Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction." *J Biol Chem* 246(24): 7825-6.
- Hoch, F. L. (1992). "Cardiolipins and biomembrane function." *Biochim Biophys Acta* 1113(1): 71-133.
- Hoppel, C. (2003). "The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism." *Am J Kidney Dis* 41(4 Suppl 4): S4-12.
- Ishii, T., Y. Shimpo, et al. (2000). "Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons." *Jpn J Pharmacol* 83(2): 119-24.
- Ito, Y., M. Ito, et al. (2003). "Neurotoxicity induced by amyloid beta-peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound." *Brain Res* 985(1): 98-107.

Iwahashi, H., H. Kawamori, et al. (1999). "Quinolinic acid, alpha-picolinic acid, fusaric acid, and 2,6-pyridinedicarboxylic acid enhance the Fenton reaction in phosphate buffer." *Chem Biol Interact* 118(3): 201-15.

Jenkins, B. G., E. Brouillet, et al. (1996). "Non-invasive neurochemical analysis of focal excitotoxic lesions in models of neurodegenerative illness using spectroscopic imaging." *J Cereb Blood Flow Metab* 16(3): 450-61.

Kessler, M., T. Terramani, et al. (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.

Kim, K. M., S. B. Chun, et al. (2001). "Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine." *Free Radic Biol Med* 30(7): 747-56.

Konisberg, M. (2008). *Radicales libres y estres oxidativo. Aplicaciones medicas, Manual moderno.*

Kremser, K., H. Stangl, et al. (1995). "Nitric oxide regulates peroxisomal enzyme activities." *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33(11): 763-74.

Lafon-Cazal, M., S. Pietri, et al. (1993). "NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity." *Nature* 364(6437): 535-7.

Lehninger, D. C., M (2005). *Principios de bioquimica, Ediciones omega.*

Lewin, G. and I. Popov (1994). "Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: Inhibition of the Cu(2+)-initiated oxidation of low density lipoproteins." *Arzneimittelforschung* 44(5): 604-7.

Lowitt, S., J. I. Malone, et al. (1995). "Acetyl-L-carnitine corrects the altered peripheral nerve function of experimental diabetes." *Metabolism* 44(5): 677-80.

Ludolph, A. C., F. He, et al. (1991). "3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin." *Can J Neurol Sci* 18(4): 492-8.

Mansour, H. H. (2006). "Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats." *Pharmacol Res* 54(3): 165-71.

Matthews, R. T., L. Yang, et al. (1998). "Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease." *J Neurosci* 18(1): 156-63.

McGeer, E. G. and P. L. McGeer (1976). "Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids." *Nature* 263(5577): 517-9.

Miller, D. M., G. R. Buettner, et al. (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." *Free Radic Biol Med* 8(1): 95-108.

- Moriguchi, T., H. Matsuura, et al. (1997). "Neurotrophic activity of organosulfur compounds having a thioallyl group on cultured rat hippocampal neurons." *Neurochem Res* 22(12): 1449-52.
- Mroczkowska, J. E., H. J. Galla, et al. (1997). "Evidence for an asymmetrical uptake of L-carnitine in the blood-brain barrier in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 241(1): 127-31.
- Muthuswamy, A. D., K. Vedagiri, et al. (2006). "Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid." *Clin Chim Acta* 368(1-2): 84-92.
- Novelli, A., J. A. Reilly, et al. (1988). "Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced." *Brain Res* 451(1-2): 205-12.
- Numagami, Y. and S. T. Ohnishi (2001). "S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia." *J Nutr* 131(3s): 1100S-5S.
- Okamoto, H., S. Yamamoto, et al. (1967). "On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase." *Biochem Biophys Res Commun* 26(3): 309-14.
- Okuda, S., N. Nishiyama, et al. (1998). "3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity." *J Neurochem* 70(1): 299-307.
- Olney, J. W., O. L. Ho, et al. (1971). "Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system." *Exp Brain Res* 14(1): 61-76.
- Paradies, G. and F. M. Ruggiero (1991). "Effect of aging on the activity of the phosphate carrier and on the lipid composition in rat liver mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 284(2): 332-7.
- Perez-De La Cruz, V., C. Gonzalez-Cortes, et al. (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): 463-74.
- Perez-De La Cruz, V., M. Konigsberg, et al. (2008). "Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic /energetic deficit synergic model in rats." *Eur J Neurosci* 27(5): 1075-85.
- Perez-De La Cruz, V., M. Konigsberg, et al. (2007). "Kynurenine pathway and disease: an overview." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(6): 398-410.
- Perez-De La Cruz, V. and A. Santamaria (2007). "Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence." *Physiol Res* 56(5): 513-26.
- Perez-Severiano, F., M. Rodriguez-Perez, et al. (2004). "S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats." *Neurochem Int* 45(8): 1175-83.

Perez-Severiano, F., R. Salvatierra-Sanchez, et al. (2004). "S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits." *Eur J Pharmacol* 489(3): 197-202.

Poeggeler, B., A. Rassoulpour, et al. (1998). "Dopaminergic control of kynurenate levels and N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing rat striatum." *Dev Neurosci* 20(2-3): 146-53.

Qin, Z., Y. Wang, et al. (2000). "A caspase-3-like protease is involved in NF-kappaB activation induced by stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum." *Brain Res Mol Brain Res* 80(2): 111-22.

Rani, P. J. and C. Panneerselvam (2001). "Protective efficacy of L-carnitine on acetylcholinesterase activity in aged rat brain." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(3): B140-1.

Reynolds, I. J. and T. G. Hastings (1995). "Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation." *J Neurosci* 15(5 Pt 1): 3318-27.

Ribeiro, C. A., V. Grando, et al. (2006). "Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats." *J Neurochem* 99(6): 1531-42.

Rios, C. and A. Santamaria (1991). "Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates." *Neurochem Res* 16(10): 1139-43.

Roberts, R. C., F. Du, et al. (1992). "Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study." *J Comp Neurol* 326(1): 82-90.

Roberts, R. C., K. E. McCarthy, et al. (1995). "3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate-containing axon terminals in the rat striatum." *J Neurosci* 15(2): 1150-61.

Rodriguez-Martinez, E., A. Camacho, et al. (2000). "Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum." *Brain Res* 858(2): 436-9.

Ryu, J. K., S. U. Kim, et al. (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(1): 150-9.

Santamaria, A., M. E. Jimenez-Capdeville, et al. (2001). "In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum." *Neuroreport* 12(12): 2693-6.

Santamaria, A. and C. Rios (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.

Savitha, S. and C. Panneerselvam (2006). "Mitochondrial membrane damage during aging process in rat heart: potential efficacy of L-carnitine and DL alpha lipoic acid." *Mech Ageing Dev* 127(4): 349-55.

- Schlame, M., D. Rua, et al. (2000). "The biosynthesis and functional role of cardiolipin." *Prog Lipid Res* 39(3): 257-88.
- Schuck, P. F., A. Tonin, et al. (2007). "Kynurenines impair energy metabolism in rat cerebral cortex." *Cell Mol Neurobiol* 27(1): 147-60.
- Schulz, J. B., D. R. Henshaw, et al. (1996). "Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity." *Neurochem Int* 29(2): 167-71.
- Schurr, A., C. A. West, et al. (1992). "The excitotoxicity of heterocyclic dicarboxylic acids in rat hippocampal slices: structure-activity relationships." *Brain Res* 571(1): 145-8.
- Schwarcz, R. and J. T. Coyle (1977). "Neurochemical sequelae of kainate injections in corpus striatum and substantia nigra of the rat." *Life Sci* 20(3): 431-6.
- Schwarcz, R., A. C. Foster, et al. (1984). "Excitotoxic models for neurodegenerative disorders." *Life Sci* 35(1): 19-32.
- Siems, W. G., T. Grune, et al. (1995). "4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine." *Life Sci* 57(8): 785-9.
- Stipek, S., F. Stastny, et al. (1997). "The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron." *Neurochem Int* 30(2): 233-7.
- Stone, T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." *Pharmacol Rev* 45(3): 309-79.
- Stone, T. W. (2001). "Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance." *Prog Neurobiol* 64(2): 185-218.
- Stone, T. W. and L. G. Darlington (2002). "Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development." *Nat Rev Drug Discov* 1(8): 609-20.
- Tagliatalata, G., L. Angelucci, et al. (1991). "Acetyl-L-carnitine enhances the response of PC12 cells to nerve growth factor." *Brain Res Dev Brain Res* 59(2): 221-30.
- Thomas, S. R., D. Mohr, et al. (1994). "Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes." *J Biol Chem* 269(20): 14457-64.
- Valko, M., M. Izakovic, et al. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Mol Cell Biochem* 266(1-2): 37-56.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." *Curr Med Chem* 12(10): 1161-208.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.
- Virmani, M. A., R. Biselli, et al. (1995). "Protective actions of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the neurotoxicity evoked by mitochondrial uncoupling or inhibitors." *Pharmacol Res* 32(6): 383-9.

Wullner, U., A. B. Young, et al. (1994). "3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum." *J Neurochem* 63(5): 1772-81.

Zeevalk, G. D. and W. J. Nicklas (1991). "Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition." *J Pharmacol Exp Ther* 257(2): 870-8.

Zeevalk, G. D. and W. J. Nicklas (1992). "Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism." *J Neurochem* 59(4): 1211-20.