



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Vulnerabilidad a la muerte neuronal
excitotóxica en el modelo R6/2 de la
enfermedad de Huntington y su relación
con los transportadores de glutamato**

T E S I S
que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

BIOL. ANA MARÍA ESTRADA SÁNCHEZ

Directora de Tesis:
Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Ciudad Universitaria, México D.F. Marzo, 2010



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.

“Dreams have to be dreamed to the end.

If not today, maybe tomorrow”

Thomas and Alexander Huber

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, bajo la tutoría de la Dra. Lourdes Massieu Trigo. Para su realización contamos con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de e Innovación tecnológica (PAPPIT IN213507) y una beca CONACyT (194940) para mis estudios de doctorado.

Agradezco a la Dra. Lourdes Massieu su apoyo, sus enseñanzas y sus consejos que han sido un impulso constante y una parte muy importante de mi formación profesional.

A la Dra. Clorinda Arias, al Dr. José Segovia, quienes desde la primera reunión tutorial que tuvimos siempre aportaron comentarios valiosos y críticas constructivas que se reflejan en este trabajo.

A mi jurado de examen: Dra. Gabriela Morali, Dra. Francisca Pérez-Severiano, Dr. Mauricio Díaz-Muñoz y Dr. Julio Morán por su revisión y comentarios a este trabajo escrito.

En especial quiero agradecer a Tere Montiel por todo aquello que me enseñó durante mi estancia en el laboratorio, que sencillamente va más allá de las técnicas de trabajo....

¡¡¡ Muchas gracias Tere!!!

También y en especial a la Señora Ceci, con quién además de compartir el sentimiento de estar en cama con una pierna rota y el arte de caminar con bastón. Gustamos de las conversaciones matutinas, ¡¡¡te quiero mucho Ceci!!!

Quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por esos momentos intensos (en todos los sentidos). A los antiguos y que ya no están ahí: Octavio, Beto, Jana, Cristian, Perla, Paloma y Marí. Y a los que aún continúan: Blanquis, Selene, Leti, Karla, Sharlen y al chico nuevo, Alberto Julio. También a los que van a comer pastel y a platicar un ratito: Luis y Alicia Dioné (Ñoñis y Ñoñe), perdón pero tenía que escribirlo así... :-D

A mis amigos de otros laboratorios: Ceci, Gaby Michel, Octavio Manitas, Marisol Orozco, Sofía, Miguel y todos aquellos que ahora se me olvidan pero que sabemos quiénes son.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que conocí en la facultad, durante las clases del doctorado, en las clases de francés y a todos los amigotes de la escalada... gracias a todos por poner un matiz diferente a la vida ¡¡¡Los quiero mucho!!!

Como un agradecimiento especial quiero dedicar este trabajo a mi familia:

Juliana y José Manuel, mis papas.

A mis hermanos María Luisa y José,

a mi sobrino Zoé

y a Bruno (mi cordada).

ÍNDICE

	Páginas
➤ Estructura de la tesis	1
➤ Resumen	4
➤ Abstract	6
➤ Introducción	
❖ Enfermedad de Huntington (EH)	8
▪ Mutación de la huntingtina (htt)	11
▪ Modelos transgénicos de la EH	11
❖ Transmisión glutamatérgica: receptores y transportadores de glutamato	13
▪ Receptores glutamatérgicos ionotrópicos	14
▪ Receptores a glutamato de tipo metabotrópico	18
▪ Transportadores de glutamato	18
❖ Muerte neuronal excitotóxica y excitotoxicidad secundaria	20
❖ Excitotoxicidad en la patogénesis de la EH	22
▪ Alteraciones en los receptores de glutamato asociados a la EH	23
▪ Papel de los transportadores de glutamato en la patogénesis de la EH	25
▪ Relación entre la excitotoxicidad y el metabolismo energético en la EH	26
▪ Excitotoxicidad, deficiencia energética y daño oxidativo en la EH	27
➤ Planteamiento del problema	29
➤ Hipótesis	31
➤ Objetivos	31
➤ Métodos	32
▪ Modelo transgénico R6/2 e identificación del genotipo a través de PCR	32

▪ Inyección intraestriatal de glutamato	32
▪ Evaluación histológica: volumen de lesión y Fluoro jade.....	33
▪ Inmunoblots	34
▪ Registro encefalográfico	34
▪ Inhibición sostenida de la GAPDH	35
▪ Análisis estadístico	36
➤ Resultados primera parte “ Muerte neuronal excitotóxica en el estriado del ratón transgénico R6/2: papel de los transportadores de glutamato y sus cambios asociados con la progresión de la enfermedad ”	37
▪ Toxicidad del glutamato en el estriado del ratón R6/2.....	37
▪ Niveles de proteína de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST.....	39
▪ Registro encefalográfico.....	42
➤ Discusión primera parte.....	45
➤ Resultados segunda parte.....	50
➤ Estandarización del modelo de estudio: inhibición sostenida de la GAPDH y curva dosis respuesta de la toxicidad del glutamato en condiciones normales y de inhibición glucolítica	51
➤ “ Muerte neuronal excitotóxica en el estriado del ratón transgénico R6/2 durante la inhibición glucolítica y su relación con cambios en los transportadores de glutamato ”	
▪ Actividad de la GAPDH y su inhibición por el tratamiento con yodoacetato.....	55
▪ Papel de los transportadores GLT-1 y GLAST en la toxicidad del glutamato durante la inhibición de la GAPDH.....	56
▪ Vulnerabilidad del estriado a la toxicidad del glutamato durante la inhibición glucolítica.....	58
➤ Discusión segunda parte.....	61
➤ Conclusión general	65

- Bibliografía..... 66
- Apéndice 76
 - Apéndice 1, Artículo de revisión:
 - *“Excitotoxic neuronal death in the pathogenesis of Huntington’s disease” Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J y Massieu L. Arch Med Res 2008;39:265-276.*
 - Apéndice 2, Artículo de Revisión 2:
 - *“Role of oxidative stress in the pathogenesis of Huntington’s disease” Estrada-Sánchez AM y Massieu L. pp: 21-36 en: New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies 2007. Santamaría A y Jimenez-Capdeville ME.*
 - Apéndice 3, Artículo publicado:
 - “Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington’s disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters”. Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J y Massieu L. Neurobiol Dis 34:78-86.*
 - Apéndice 4, manuscrito enviado:
 - *“Glycolysis inhibition decreases the levels of glutamate transporters and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington’s disease mice” Estrada-Sánchez AM, Montiel T, y Massieu L. Sometido a Neurochemical Research.*

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

SIGNIFICADO

3-NP	ácido-3-nitropropiónico
AMPA	a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
EAAC1	Excitatory aminoacid carrier 1
EAAT	Excitatory aminoacid transporter
EH	Enfermedad de Huntington
GAF	glutaminasa activada por fosfatos
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLAST	Glutamate aspartate transporter
Gln	glutamina
GLT-1	Glutamate transporter 1
HAP1A	huntingtin associated protein-1A
Htt	huntingtina
IOA	yodoacetato
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
mGluR	receptores metabotrópicos a glutamato
mhtt	huntingtina mutada
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo-(a,d)-cicloheptano-5,10-imina maleato
MPEP	2-metil-6-(feniletinil)-piridina
NAS	1-naftil acetil espermina

NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina
NEM	neuronas espinosas medianas
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCP	fenilciclidina
PKC	proteína cinasa C
YAC	yeast artificial chromosome

➤ ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente tesis está organizada de la siguiente manera:

- ❖ **Introducción:** en esta sección se describen las características fenotípicas y neuropatológicas de la enfermedad de Huntington (EH). Se describe la mutación que origina la enfermedad y los modelos transgénicos que se han desarrollado a partir de la descripción de ésta, incluyendo el modelo R6/2, en el cual se desarrolló el presente trabajo de investigación. En la segunda parte de la introducción se describen los componentes de la neurotransmisión glutamatérgica, así como las alteraciones en los receptores y los transportadores de glutamato que pueden derivar en un proceso excitotóxico. En esta misma sección se aborda el papel del metabolismo energético en la toxicidad del glutamato, y finalmente se describen las alteraciones en la transmisión glutamatérgica y en el metabolismo energético que se han asociado a la EH. Al final de la tesis, en la sección de apéndices, se incluyen un artículo de revisión y un capítulo de un libro en dónde se aborda a mayor profundidad el papel de la muerte neuronal excitotóxica y del estrés oxidativo en la patogénesis de la EH.

- ❖ **Planteamiento del problema, Hipótesis y Objetivos.**

- ❖ **Métodos.** En esta sección se describen brevemente las técnicas experimentales utilizadas. Éstas pueden también consultarse en los artículos y manuscritos incluidos al final de la tesis en la sección de apéndices.

- ❖ **Resultados.** Esta sección se divide en dos partes. En la primera se describen resultados que sugieren una correlación entre los cambios en el contenido de los transportadores de glutamato y la vulnerabilidad del estriado del ratón R6/2 a la toxicidad de este neurotransmisor. Inmediatamente después se presenta la discusión de estos resultados. El artículo de investigación en donde se publicaron estos resultados se incluye en la sección de apéndices: **Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J y Massieu L. Neurobiol Dis 34:78-86.**

En la segunda parte de esta sección se presentan resultados sobre los cambios en el contenido de los transportadores de glutamato por efecto de la inhibición glucolítica, y su relación con la vulnerabilidad del estriado del ratón R6/2 a la toxicidad de este aminoácido. Inmediatamente después se presenta una discusión de estos resultados. Los resultados presentados en esta sección se incluyeron en el siguiente manuscrito: **Glycolysis inhibition decreases glutamate transporters levels and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington's disease mice.** Estrada-Sánchez AM, Montiel T y Massieu L, que ha sido sometido a publicación y se incluye en la sección de apéndices.

❖ **Conclusión general**

❖ **Bibliografía**

- ❖ **Apéndices:** esta sección contiene un artículo de revisión y un capítulo de un libro en donde se aborda el papel de la muerte neuronal excitotóxica y del estrés oxidativo en la patogénesis de la EH:

“Excitotoxic neuronal death in the pathogenesis of Huntington's disease” Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J y Massieu L. Arch Med Res 2008;39:265-276.

“Role of oxidative stress in the pathogenesis of Huntington's disease” Estrada-Sánchez AM y Massieu L. pp: 21-36 en: New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies 2007. Santamaría A y Jimenez-Capdeville ME.

También se incluyen los artículos de investigación, que contienen los resultados de esta tesis doctoral:

“Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington’s disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters”. Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J y Massieu L. Neurobiol Dis 34:78-86.

“Glycolysis inhibition decreases the levels of glutamate transporters and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington’s disease mice” Estrada-Sánchez AM, Montiel T, y Massieu L. Aceptado para su publicación en la revista Neurochemical Research.

➤ **RESUMEN**

La enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de las neuronas espinosas medianas (NEM) del caudado-putamen, las cuales posiblemente mueren por un mecanismo excitotóxico mediado por la activación de los receptores a glutamato. La participación de este mecanismo se sugirió a partir de la observación de que la administración de agonistas de los receptores a glutamato genera una lesión semejante a la descrita en pacientes con EH. En este sentido, se ha reportado que la expresión de la huntingtina mutada (mhtt), característica de la EH, conduce a la alteración de algunos componentes de la neurotransmisión glutamatérgica, que eventualmente pueden promover el daño excitotóxico. Se han descrito tanto en pacientes con EH como en modelos transgénicos murinos de la enfermedad, una disminución en el contenido de proteína de los transportadores de glutamato, así como en la captura del neurotransmisor. Sin embargo, la contribución de los transportadores de glutamato a la vulnerabilidad de las NEM a la excitotoxicidad, en la EH no se ha estudiado. Una falla en la función de estos transportadores da lugar a que el neurotransmisor permanezca por un tiempo más prolongado en el espacio sináptico, activando continuamente sus receptores y desencadenando la muerte excitotóxica. Con base en estos antecedentes el primer objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad del glutamato en el estriado del ratón transgénico R6/2 de la EH, y su posible correlación con cambios en los niveles de los transportadores de glutamato, GLAST y GLT-1. Los resultados indican una correlación entre la disminución en los niveles de GLT-1 y GLAST y la toxicidad del glutamato en el estriado del ratón R6/2, la cual se manifiesta a las 14 semanas de edad. A las 10 semanas de edad, cuando los niveles de GLAST y GLT-1 son semejantes entre el grupo silvestre y el transgénico, ambos grupos son igualmente vulnerables al daño inducido por glutamato. Además, la administración de glutamato produce crisis epilépticas en los ratones R6/2, mismas que se identificaron a través del monitoreo de la actividad eléctrica cerebral. Estos resultados sugieren que la falla en la captura del glutamato está asociada con una mayor vulnerabilidad del estriado a la toxicidad de este aminoácido en la EH.

Por otra parte, no se ha estudiado el papel del metabolismo glucolítico sobre la vulnerabilidad de las NEM a la toxicidad del glutamato, pero existe evidencia de que la captura y metabolismo de glucosa están disminuídos en algunos pacientes con la EH.

De acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio, y de otros grupos, sabemos que la producción de energía a través de la glucólisis es importante para mantener el funcionamiento de los transportadores de glutamato. Hemos demostrado que la inhibición glucolítica disminuye la captura de glutamato y los niveles de GLT-1, facilitando la toxicidad del ácido glutámico en el hipocampo y el estriado de la rata *in vivo*. Por lo tanto el segundo objetivo de esta tesis fue evaluar si la disminución del transportador GLT-1 inducida por la inhibición glucolítica, facilita el daño excitotóxico en el estriado de los ratones silvestres y de los ratones R6/2, a las 10 semanas de edad. Los resultados demuestran que el tratamiento con el inhibidor de la enzima glucolítica, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), yodoacetato (IOA), induce una disminución significativa de los niveles de GLT-1 y GLAST en el estriado y la corteza cerebral, y facilita la lesión excitotóxica. Los cambios observados son muy similares entre los ratones silvestres y transgénicos.

En su conjunto, los resultados presentados en esta tesis doctoral apoyan la participación de la muerte neuronal excitotóxica en una etapa tardía de la EH, y sugieren que la alteración en la recaptura de glutamato es un factor desencadenante de este proceso. Por otra parte una disminución sostenida del metabolismo glucolítico puede ser un factor asociado a la precipitación del daño excitotóxico en la enfermedad.

➤ **ABSTRACT**

Excitotoxic neuronal death has been related to the loss of medium spiny neurons (MSN) in the caudate-putamen in Huntington's disease (HD), a neurodegenerative disorder caused by the mutation in the huntingtin protein (mhtt). This hypothesis was suggested based on the observation that over-activation of glutamate receptors leads to neuropathologic changes similar to those observed in HD patients. Moreover, the expression of mhtt leads to altered glutamatergic neurotransmission, which eventually might trigger an excitotoxic death cascade. Among them, alterations in glutamate transporters have been consistently reported, both in HD patients and transgenic models. However, a relationship between failure of glutamate transport and the vulnerability of MSN to excitotoxic neuronal death has not been studied in HD. Therefore, in the present study we have evaluated the vulnerability of the R6/2 transgenic mice to glutamate toxicity, and whether glutamate-mediated damage correlates with changes in the content of GLAST and GLT-1 glutamate transporters. Our results show that increased glutamate neurotoxicity is observed in R6/2 mice at 14 weeks of age when a significant reduction in the levels of glutamate transporters is observed in the cortex and the striatum, as a consequence of the disease progression. In contrast, at 10 weeks of age R6/2 and wild-type mice show the same vulnerability to glutamate neurotoxicity, and no change in glutamate transporters.

On the other hand, the role of glycolytic metabolism in MSN vulnerability to the excitotoxic lesion has not been studied, but evidence show that glucose uptake and oxidation is diminished in HD patients. Previous studies by others and our group have shown a role of glycolysis as an energy source for the control of glutamate uptake. We have shown previously that inhibition of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) by iodoacetate (IOA) induces a decrease in glutamate uptake and in the content of GLT-1, which is related to the enhancement of glutamate toxicity in the striatum and hippocampus *in vivo*. Based on these observations, the second aim of this work was to evaluate whether a decrease in GLT-1 transporter induced by glycolysis inhibition exacerbates glutamate excitotoxicity in the striatum of wild-type and R6/2 mice, at 10 weeks of age. Results show that IOA treatment induces a significant reduction in GLT-1 and GLAST content in the

striatum and cerebral cortex, which is related to the facilitation of the excitotoxic lesion. The changes observed are similar in both groups of animals.

Altogether the present results support the role of glutamate-mediated damage on the loss of striatal neurons at late stages of HD, and suggest that altered glutamate removal might trigger this process. These results also suggest that a sustained impairment of the glycolytic pathway might be associated with altered glutamate removal and the induction of excitotoxic damage.

➤ INTRODUCCIÓN

❖ Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento neurodegenerativo, hereditario, originado por la mutación de la huntingtina (htt), una proteína que en su extremo N-terminal presenta un número variable de repetidos del aminoácido glutamina (gln) (Gusella et al., 1983; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Normalmente la htt contiene de 3 a 30 repeticiones de este aminoácido y se considera mutada cuando presenta un número igual o mayor a 35 residuos. La incidencia de la EH en la población es de 5-10 casos por 100,000 habitantes y en México, de acuerdo con estadísticas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se han reportado 8,000 casos (www.innn.edu.mx).

La EH se transmite de manera autosómica dominante, es decir es suficiente un alelo mutado para que se presente el padecimiento. También se han reportado casos homocigotos en la región del Maracaibo en Venezuela, un lugar en el que la incidencia de la enfermedad es muy alta. La progresión de la enfermedad es la misma tanto en heterocigotos como en homocigotos (Harper, 1991). Sin embargo, dependiendo del número de repeticiones de gln que presente la htt, la edad de inicio de la enfermedad varía: la forma que se presenta en los adultos se relaciona con un número de repetidos de 35 en adelante, mientras que la forma juvenil se manifiesta cuando la htt tiene más de 60 repeticiones de gln. La manifestación juvenil está asociada a la transmisión por vía paterna y se caracteriza por un severo deterioro mental, rigidez corporal y por la presencia de crisis epilépticas; la muerte de los pacientes generalmente ocurre antes de los 20 años de edad (Rasmussen, 2000; Nance y Miers, 2001). Por otra parte, la forma adulta de la enfermedad presenta un fenotipo característico que se divide en tres etapas; cada una de ellas tiene una duración aproximada de 5 años. En la etapa 1, los pacientes presentan alteraciones psiquiátricas como depresión, irritabilidad, alteraciones de la personalidad y psicosis, entre otras. Alrededor de los 35-45 años de edad inician las alteraciones motoras, que se evidencian por la presencia de tics y temblores que pueden comprometer movimientos finos, sin embargo la actividad física del individuo no se ve limitada. Progresivamente las alteraciones motoras se acentúan y es en la segunda etapa, que la presencia de movimientos involuntarios generalizados impide que el paciente realice actividades por sí mismo. En esta fase además de la hiperkinesia, hay pérdida acentuada del peso corporal y de las capacidades mentales. En

la tercera etapa o acinética, la rigidez corporal substituye a los movimientos corporales abruptos. En esta etapa (15 a 20 años después de las alteraciones iniciales) el estado físico del paciente se encuentra muy deteriorado, facilitando la presencia de infecciones u otros estados patológicos que culminan con la muerte del individuo (Harper, 1991).

De acuerdo con estudios neuropatológicos, los cerebros *post mortem* de pacientes con la EH presentan una disminución de 200 a 300 g en el peso total. La región más atrofiada es la del neostriado, que incluye el caudado, el putamen y el globo pálido; sin embargo también se ha descrito atrofia en las capas 3 y 5 de la corteza cerebral (Graveland et al., 1985). La composición celular del caudado-putamen es heterogénea y está formado por las neuronas espinosas medianas (NEM) que constituyen el 90-95% de la población celular, y por tres tipos de interneuronas: las colinérgicas grandes no espinosas, que utilizan a la acetilcolina como principal neurotransmisor y las medianas no espinosas que son de dos tipos, las que contienen somatostatina y neuropéptido Y y las que contienen GABA. Las NEM son neuronas gabaérgicas que reciben proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza motora y proyecciones dopaminérgicas de la sustancia nigra reticulata. Las NEM constituyen la vía de salida del caudado-putamen hacia el globo pálido. Debido a que el globo pálido se divide en la región externa e interna, las NEM se dividen en dos grupos principales: NEM que constituyen la vía indirecta que envían sus proyecciones hacia el globo pálido externo, que además de GABA liberan neuropéptidos como la encefalina y la neurotensina. El otro grupo constituye la vía directa que proyectan hacia el globo pálido interno, cuya señalización involucra al GABA, sustancia P y dinorfina. Las primeras neuronas que se mueren son las de la vía indirecta que contienen GABA y encefalina, lo cual resulta en una desinhibición de las neuronas talámicas y del globo pálido y por lo tanto una hiperactividad de la vía tálamo cortical dando lugar a la aparición de los movimientos coreicos. En etapas más tardías desaparecen las neuronas que contienen GABA y sustancia P coincidiendo con la aparición de la fase acinética.

De acuerdo con la evaluación de cerebros *post mortem*, en la fase inicial de la EH no se aprecia pérdida neuronal en el neostriado. En la fase cinética hay una disminución del 50% de las NEM y para la fase acinética el 95% de las NEM ha muerto. A consecuencia de la pérdida de las NEM hay dilatación de los ventrículos laterales (Figura 1). Basado en estos estudios neuropatológicos, se establecieron 4 grados que describen la severidad de la pérdida neuronal del estriado: grado 0-1 que involucra a la etapa inicial cuando la pérdida neuronal es mínima; grado 2 hay una reducción del 50 % de las NEM que corresponde a la etapa de hiperkinesia y grado 3-4

que describe la pérdida masiva de las NEM que caracteriza a la fase final de la enfermedad (Vonsattel et al., 1985). Aún cuando la degeneración del caudado-putamen es muy severa, la pérdida de las NEM es progresiva y ocurre con una orientación caudado-rostral.

A pesar de que la htt mutada (mhtt) se expresa en todo el cerebro, la neurodegeneración más severa ocurre en el caudado-putamen, sin embargo la relación que existe entre la mutación de la htt y la vulnerabilidad selectiva de las NEM a la EH, no es clara. Se ha sugerido que la deficiencia en el metabolismo energético y la toxicidad por glutamato son dos factores relacionados con la muerte de las NEM, ya que la administración de análogos del glutamato o de toxinas metabólicas como el ácido 3-nitriopropiónico (3-NP) en roedores, reproduce algunas características histopatológicas y bioquímicas de la EH (Schwarcz y Coyle, 1977; McGeer y McGeer, 1976; Palfi et al., 1996; Beal et al., 1993).



Figura 1. Alteraciones morfológicas cerebrales en la EH. Se observa una reducción en el tamaño total cerebral así como una atrofia general en un cerebro de un paciente *post mortem* con EH en relación al de un individuo que no padecía EH. La región más afectada es el caudado-putamen, que se evidencia por el ensanchamiento de los ventrículos laterales como consecuencia de la pérdida de la población neuronal de esta región (Harper, 1991).

Mutación de la htt

El gen de la *htt* se localiza en la región 16.3 del brazo corto del cromosoma número 4 y está constituido por 67 exones, el primero contiene una región polimórfica rica en repetidos de CAG; codón para la gln (Ambrose et al., 1994). La transcripción de este gen produce una proteína de 350 kDa, que se caracteriza por presentar en el extremo terminal una región que contiene un número variable de repetidos del gln. La *htt* se expresa ubicuamente en todo el organismo; debido a que no existe una proteína homóloga en secuencia, el papel fisiológico de la *htt* se desconoce. Sin embargo, se le ha asociado con procesos de transcripción, transporte vesicular, síntesis y liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), entre otros (Cattaneo et al., 2005). En 1995 se identificó que el aumento del contenido de CAG en el primer exón de la *htt* es el responsable de la EH. Sin embargo los procesos celulares afectados por la mutación en la *htt* no se han dilucidado completamente. En este sentido, el desarrollo de animales transgénicos ha permitido conocer más sobre las alteraciones subyacentes a la expresión de la *mhtt* y su posible relación con la patogénesis de la EH.

Modelos transgénicos de la EH

A partir de la descripción de la mutación que da lugar a la EH se han desarrollado diversos modelos transgénicos, algunos de ellos expresan un fragmento de la *mhtt* mientras que otros expresan la proteína completa. Estos ratones además del transgen, expresan los dos alelos endógenos de la *htt*. Para evitar cambios originados por la carga genética causada por la expresión de ambos alelos más el fragmento insertado, se han desarrollado modelos *knock-in* a los que se les ha insertado repetidos de CAG en el gen endógeno de la *htt*. Los modelos que contienen el fragmento N-terminal de la *mhtt* humana son: R6/1, R6/2, N171-82Q y la rata transgénica (Von Hörsten et al., 2003). La línea R6 en ratón fue la primera en desarrollarse, estos animales contienen el promotor y el primer exón de la *mhtt* humana y dependiendo del número de repetidos de CAG que presenten se desarrollaron la línea R6/1 que contiene ~116 repeticiones y la línea R6/2 que contiene ~156 repetidos del trinucleótido (Mangiarini et al., 1996). El periodo de vida del ratón R6/1 es de 14 meses (Mangiarini et al., 1996; Carter et al., 1999). Este ratón presenta una disminución en el peso corporal a las 22 semanas y alteraciones motoras a los 4-5 meses de edad. Aún cuando este modelo no desarrolla muerte neuronal, presenta alteraciones morfológicas celulares y también agregados intracelulares que contienen a la *mhtt* (Ferrante, 2009).

El modelo R6/2 desarrolla un fenotipo progresivo semejante al descrito en los pacientes en un periodo de 16 semanas; las alteraciones fenotípicas son evidentes a las 9 semanas de edad. Este modelo desarrolla alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales, incluso a edades tempranas. Por ejemplo, la presencia de agregados proteicos intracelulares se observa desde la tercera semana en el estriado, el hipocampo y la corteza cerebral (Weiss et al., 2008). En la octava semana de edad el peso cerebral disminuye 19%, asimismo hay dilatación ventricular generada por la reducción del volumen celular de las NEM, y es hasta las 14-16 semanas cuando se ha reportado degeneración neuronal (Stack et al., 2005). El modelo N171-82Q expresa 82 repeticiones de CAG y presenta disminución en el peso corporal, atrofia cerebral, ensanchamiento de los ventrículos laterales originado por la pérdida neuronal (Schilling et al., 1999). El modelo transgénico desarrollado en la rata expresa 51 repeticiones de CAG, en este caso la expresión del fragmento está dada por el promotor de la *htt* de la rata; aún cuando no se ha reportado el tiempo máximo de sobrevivencia de este modelo, se sabe que pierde peso corporal a los 24 meses y que presenta déficits cognitivos a los 12 meses.

También se ha reportado que este modelo desarrolla ensanchamiento de los ventrículos laterales, agregados intracelulares y muerte neuronal (Schilling et al., 1999). Por otra parte, el modelo YAC (yeast artificial chromosome) contiene el gen completo de la *mhtt* humana y puede contener 46, 72 ó 128 repeticiones de CAG (YAC46, YAC72 y YAC128, respectivamente). El modelo YAC también desarrolla alteraciones motoras, cognitivas y pérdida del peso corporal (Hodgson et al., 1999). En este caso el periodo de vida es mayor, comparado con la línea R6 que también desarrolla agregados intracelulares y muerte neuronal (Van Raamsdonk et al., 2007). Más recientemente se desarrolló otro modelo que expresa la *mhtt* completa; se trata del ratón BAC (bacterial artificial chromosome), que contiene 240 kDa de BAC conteniendo 170 kb del locus de la *mhtt* humana. De igual manera desarrolla alteraciones motoras y cognitivas (Gray et al., 2008; Spampanato et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, el modelo *knock-in* se generó a partir de la inserción de varios repeticiones del trinucleótido CAG en el gen endógeno de la *htt* del ratón; de éstos se han creado los siguientes variantes: Hdh/Q72-80 (que expresa 72-80 repeticiones de CAG); HdhQ111 (expresando 111 repetidos de CAG); los modelos CAG140 y CAG150. De manera semejante, los modelos *knock-in* desarrollan alteraciones fenotípicas semejantes a las observadas en los pacientes: presentan agregados

intracelulares que contienen a la mhtt, atrofia en el estriado y en algunos casos muerte neuronal (Menalled, 2005).

Como se ha descrito en esta sección hay diversos modelos transgénicos de la EH. A pesar de las diferencias genéticas que cada uno de estos modelos presenta, es común observar la presencia de alteraciones fenotípicas semejantes a las descritas en los pacientes, asimismo también comparten alteraciones neuroquímicas y estructurales características de la EH. Sin embargo, una diferencia fundamental es el periodo de vida de cada uno de estos modelos. Considerando esta característica, los modelos que presentan un fenotipo acelerado y bien característico como la línea R6/2 en ratón son de gran utilidad para evaluar la eficacia de tratamientos terapéuticos. Sin embargo, este modelo no es el mejor para evaluar los cambios cognoscitivos de la enfermedad, ya que la progresión de la enfermedad es muy acelerada impidiendo que estos animales sean entrenados y así evaluar este aspecto de la EH. En este sentido los modelos que presentan un periodo más largo de vida pueden ser utilizados para estudios de deterioro cognoscitivo, así como otros aspectos de la patología. Por lo tanto, se puede seleccionar el modelo más adecuado, dependiendo del estudio que se quiera llevar a cabo. Sin embargo, si el modelo a estudiar no ha sido el más utilizado, es difícil situar los resultados en un contexto más amplio. El modelo ampliamente usado es el ratón de la línea R6/2, que se ha utilizado para la evaluación tanto de los cambios neuroquímicos inducidos por la expresión de la mhtt, como de la eficacia de tratamientos terapéuticos. Sin embargo, este modelo se ha considerado más cercano a la manifestación juvenil de la EH, que a la forma adulta. Tomando en cuenta todas las características de cada modelo transgénico de la EH, es difícil situar a alguno de ellos como el más cercano a lo que ocurre en el paciente con EH, por lo que es necesario ubicar el trabajo en el contexto adecuado.

❖ **Transmisión glutamatérgica: receptores y transportadores de glutamato**

La participación de un mecanismo excitotóxico, mediado por glutamato en la muerte neuronal asociada con la EH, fue sugerida por experimentos pioneros demostrando que las lesiones inducidas en el cuerpo estriado de la rata, por la administración de agonistas de los receptores a glutamato, son semejantes a la lesión que se presenta en los pacientes con EH (McGeer y McGeer, 1976; Schwarcz y Coyle, 1977; Schwarcz et al., 1984).

En este apartado de la tesis se revisará brevemente la neurotransmisión glutamatérgica y su papel en la neurodegeneración asociada a la EH, que es el tema central.

El ácido glutámico es el neurotransmisor excitador más abundante del sistema nervioso central en mamíferos. La comunicación mediada por el glutamato inicia con la liberación vesicular del neurotransmisor en respuesta a la despolarización de la terminal presináptica; una vez liberado, el glutamato activa a sus receptores, localizados en la neurona postsináptica. Los receptores a glutamato se dividen en dos grupos: los receptores ionotrópicos, que son proteínas transmembranales que forman un poro permeable a ciertos iones, y los receptores metabotrópicos, cuya activación está asociada con la señalización intracelular mediada por segundos mensajeros. La unión del glutamato a los receptores de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato)/kainato permite la entrada de sodio a la neurona, despolarizando la membrana postsináptica.

El cambio en el potencial de la membrana generado por la activación de los receptores AMPA/kainato permitirá la liberación del ion magnesio, que se encuentra bloqueando el poro del receptor de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato). La unión del glutamato y la glicina activará al receptor NMDA lo que permitirá el paso de calcio y sodio a la neurona. También el glutamato activará a sus receptores metabotrópicos (ver más adelante). Es a través de la activación de los diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos que se propaga el estímulo excitador. Finalmente, el glutamato se elimina del espacio sináptico a través de transportadores específicos que se localizan en la membrana de los astrocitos y de las neuronas. Una representación de la transmisión glutamatérgica se esquematiza en la Figura 2.

Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Los receptores a glutamato de tipo ionotrópico se dividen en dos grupos: los receptores NMDA y los receptores no-NMDA que a su vez incluyen a los receptores AMPA y kainato. Se denominan de esta manera en función del agonista que los activa de manera selectiva. Los receptores ionotrópicos son poros transmembranales que se forman por el ensamble de 4 subunidades diferentes; la combinación de éstas confiere propiedades específicas al receptor. Los receptores de tipo NMDA se forman con la combinación de las subunidades NR1, NR2, NR3 (Albensi, 2007; Cull-Candy et al., 2001). Se han descrito 8 variantes de la subunidad NR1, en esta subunidad se

encuentra el sitio de unión para la glicina o la D-serina, coagonistas del receptor NMDA; la presencia de esta subunidad es necesaria para que el receptor sea funcional. Se han reportado 4 isoformas de la subunidad NR2 (A-D), que contienen el sitio de unión al glutamato.

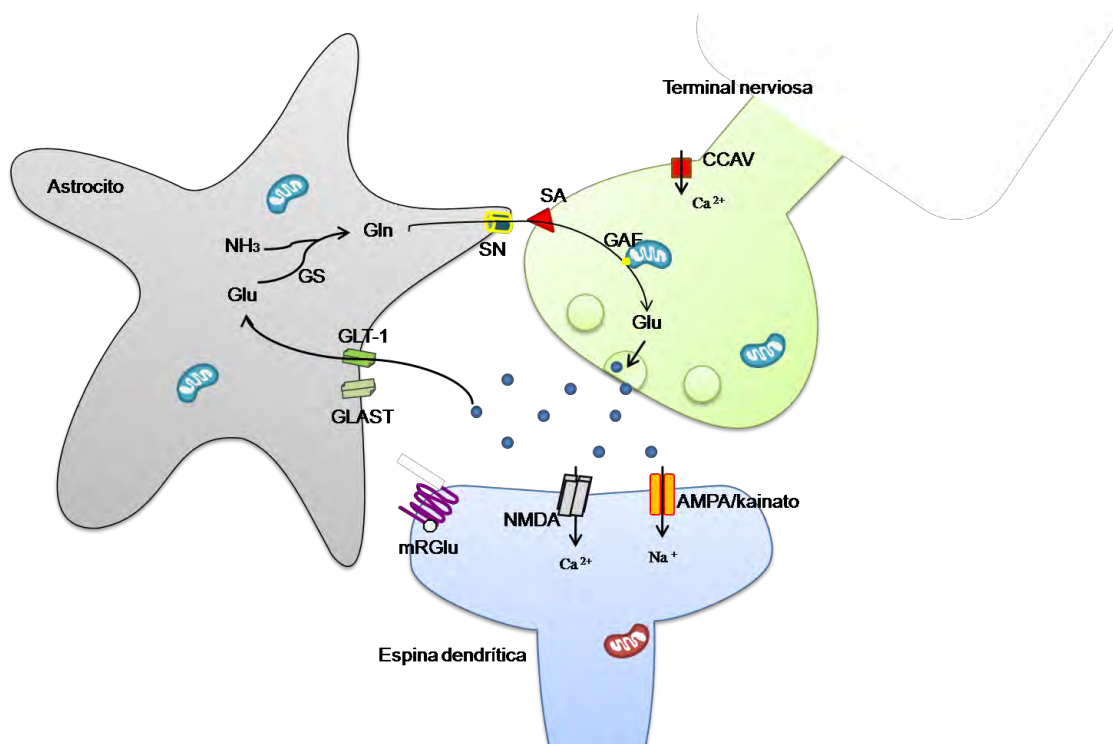


Figura 2. Transmisión glutamatérgica. La liberación presináptica del glutamato (glu) ocurre después de la despolarización membranar de la terminal presináptica, que permite la activación de los canales CCAV permeables a calcio. En el espacio sináptico el glutamato activará a sus receptores ionotrópicos (AMPA/kainato y NMDA) y metabotrópicos (mGluR). La activación de los receptores AMPA/kainato permitirá la entrada de sodio a la espina dendrítica despolarizando la membrana, liberando así el ion magnesio que se encuentra bloqueando el canal del receptor NMDA. La apertura de este receptor permitirá el flujo de calcio y sodio al interior de la neurona. Por otra parte, la activación de los receptores metabotrópicos permitirá la progresión de cascadas intracelulares de señalamiento que culminarán en cambios a largo o corto plazo. Los transportadores de glutamato que se localizan principalmente en las membranas de los astrocitos (GLAST y GLT-1), se encargan de mantener una concentración baja de glutamato en el espacio extracelular, evitando la acumulación del neurotransmisor. Estas proteínas toman una molécula de glutamato más 2 iones Na^{2+} y los internalizan mientras extruyen un ion K^+ y un protón, utilizando el gradiente de sodio generado por la ATPasa $\text{Na}^{2+}/\text{K}^+$. En el citoplasma de los astrocitos, el glutamato es metabolizado a glutamina (gln) por la glutamina sintetasa (GS). La gln es transportada al espacio sináptico a través de un sistema de transporte N (SN), de donde será capturada por la terminal nerviosa por transportadores del sistema A (SA). Dentro de la mitocondria la gln se metabolizará nuevamente a glutamato por la glutaminasa activada por fosfatos (GAF). De esta manera se cierra el ciclo de la glutamina-glutamato, culminando con la producción del neurotransmisor que se almacenará en vesículas para después ser liberado. (Estrada-Sánchez et al., 2008).

La presencia de las subunidades NR2A o NR2B aumenta la sensibilidad del receptor al bloqueo por magnesio en relación con los receptores que contienen a las subunidades NR2C o NR2D. Se han descrito dos variantes de la subunidad NR3, que son las NR3A y NR3B, que se ha sugerido tienen un papel modulador sobre la actividad del receptor: la presencia de ésta reduce la permeabilidad al calcio y el bloqueo del poro por el magnesio (Matsuda et al., 2002; Sasaki et al., 2002). Además de poseer sitios de unión para el glutamato y la glicina, el receptor NMDA también tiene sitios de unión a poliaminas (espermina y espermidina), un sitio de unión al Zinc, un sitio de unión a protones y un sitio de óxido-reducción, lo cual sugiere una alta regulación de este receptor.

La presencia de las diferentes subunidades del receptor NMDA cambia dependiendo de la edad y de la región cerebral. La distribución de la subunidad NR1 es homogénea, ya que es necesaria la presencia de esta subunidad para que el receptor sea funcional (Michaelis, 1998). La subunidad NR2A se expresa en la corteza cerebral y cerebelar y en el hipocampo. Los receptores que expresan a la NR2B se localizan principalmente en el telencéfalo; la subunidad NR2C se localiza en células granulares del cerebelo y la NR2D se expresan en el diencefalo y tallo cerebral (Michaelis, 1998). La subunidad NR3A se localiza de manera generalizada en el cerebro y la NR3B se expresa en las motoneuronas (Das et al., 1998). Por otra parte, las NEM en el neocórtex expresan principalmente las subunidades NR1 y NR2B (Ravenscroft y Brotchie, 2000).

Los receptores NMDA son sensibles al bloqueo farmacológico por diversas moléculas, las cuales pueden unirse ya sea al sitio de unión al agonista, como el D-APV (D-2-amino-5-fosfonolvalerato), al sitio de unión al coagonista como el ácido 5,7-dicloro-kinurenato, o a sitios en el poro del receptor que bloquean el canal abierto como el (+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo-(a,d)-cicloheptano-5,10-imina maleato (MK-801), la fenilciclidina (PCP) y la memantina (1-amino-3,5-dimetil-clorhidrato de adamantina) (Kew y Kemp, 2005).

La composición de las subunidades del receptor NMDA, está directamente asociada con la conducción selectiva de iones. Estos receptores permiten el paso de calcio principalmente, ya que en la región Q/R de todas las subunidades de este receptor se localiza una asparagina. Se ha observado que si a través de mutagénesis dirigida se cambia la asparagina por una arginina, los receptores NMDA disminuyen su permeabilidad al calcio (Wollmuth et al., 1996). Es interesante que todos los

receptores ionotrópicos a glutamato contienen un sitio Q/R y que dependiendo del aminoácido que contengan los receptores serán o no permeables a calcio.

Los receptores AMPA son poros transmembranales formados por el ensamble de las subunidades GluR1-GluR4, principalmente permeables a Na^{2+} y K^+ . Sin embargo, los receptores que no tienen a la subunidad GluR2 son permeables a calcio. La presencia de la subunidad GluR2 impide el paso de calcio porque en el dominio M2 de ésta ocurre una modificación post-transcripcional, en la que se cambia una gln (Q) por una arginina (R) que contienen una carga positiva, obstaculizando el paso de los iones calcio. En el cerebro adulto de la rata, la subunidad GluR2 se encuentra editada en su mayoría, es decir presenta una arginina en la región Q/R y por lo tanto los receptores a AMPA no son permeables a calcio (Kew y Kemp, 2005). Las subunidades GluR1, GluR2 y GluR3 se expresan en todo el sistema nervioso central; la subunidad GluR4 se expresa principalmente en la corteza cerebelar y en las células granulares del giro dentado en el hipocampo (Romano et al., 1998; Kew y Kemp, 2005).

Los receptores kainato se forman por el ensamble de subunidades agrupadas en dos familias: GluR5-GluR7 y KA1-KA2. Los receptores KA homoméricos no son funcionales, a menos que se ensamblen con alguna de las subunidades GluR5-GluR7. En este caso la presencia de una arginina o una glutamina en el sitio Q/R de sus subunidades, confiere distintos grados de permeabilidad al calcio dependiendo de la combinación de subunidades que contengan, ya que no todas están editadas (Hassel y Dingledine, 2006). Los receptores a kainato se localizan principalmente en las terminales presinápticas en las interneuronas del hipocampo, amígdala lateral, corteza cerebral y globo pálido (Huettner, 2003). Estos receptores tienen características farmacológicas semejantes a los receptores AMPA de tal manera que los principales antagonistas de los receptores AMPA también inhiben a los receptores kainato. Los principales antagonistas son la 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) que también bloquea a los receptores de tipo kainato y tiene afinidad por el sitio de la glicina de los receptores NMDA, y la 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX) que es más selectiva para los receptores AMPA. Los receptores AMPA permeables a calcio se pueden inhibir de manera selectiva con el 1-Naftil acetil espermina (NAS).

Por otra parte, también se han descrito receptores kainato cuyo modo de acción involucra segundos mensajeros como la $G_{i/o}/\text{PLC}/\text{PKC}$ (Lerma, 2003). Se ha reportado que estos receptores principalmente se localizan en la terminal presináptica

y se encargan de modular la liberación de GABA y de glutamato (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998).

Receptores a glutamato de tipo metabotrópico

Los receptores metabotrópicos a glutamato (mGluR) son proteínas que cruzan siete veces la membrana plasmática y que se encuentran acoplados a proteínas G, las cuales están involucradas en cascadas de activación intracelular. El sitio de unión al glutamato en los mGluR se encuentra en el sitio N-terminal del asa extracelular (Conn y Pin, 1997). De acuerdo con la vía de transducción de señales y la analogía en la secuencia de aminoácidos, los mGluR se dividen en tres grupos. El grupo I está formado por los receptores mGluR1 y mGluR5 que están acoplados a proteína $G_{\alpha q}$. La activación de estos receptores genera un aumento en la hidrólisis de fosfoinosítidos que posteriormente activa a la fosfolipasa $C\beta 1$ (PLC $\beta 1$). A su vez, esta activación conducirá a la formación de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Mientras el diacilglicerol activa a la proteína cinasa C (PKC), el IP_3 activa a sus receptores localizados en el retículo endoplásmico, permitiendo la liberación de calcio de este organelo. Los mGluR pertenecientes a este grupo se localizan principalmente en la postsinapsis (Kim et al., 2008). El grupo II está constituido por los receptores mGluR2 y mGluR3 que están acoplados a la proteína $G_{\alpha i/o}$, inactivando a la adenilato ciclasa e inhibiendo la formación de AMPc. Estos receptores se pueden encontrar tanto en la membrana pre- como post-sináptica (Kim et al., 2008). Finalmente el grupo III está formado por los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8, que al igual que los del grupo II, están acoplados negativamente a la proteína $G_{\alpha i/o}$, y por tanto disminuyen los niveles de AMPc. Estos receptores se localizan fundamentalmente en la membrana presináptica (Kim et al., 2008). La activación de los mGluR está asociada con diversos procesos, como la regulación de la liberación de neurotransmisores o con cambios a largo plazo que involucran modificaciones en la regulación transcripcional de la neurona, entre otros.

Transportadores de glutamato

Los transportadores de glutamato son proteínas transmembranales que se encargan de regular la concentración extracelular del neurotransmisor; factor determinante en algunas neuropatologías que involucran la toxicidad del glutamato. Se ha sugerido que la concentración extracelular de glutamato aumenta hasta 1 mM

durante la liberación presináptica, y que de no ser por la remoción del aminoácido por la acción de sus transportadores, esta concentración podría dañar a las neuronas (Clements et al., 1992). Los transportadores de glutamato se clonaron en 1994 a partir de tejido cerebral de humano (Arriza et al., 1994), y de acuerdo con la nomenclatura en inglés “Excitatory Amino Acid Transporters” (EAAT) se denominan: EAAT1/GLAST (Glutamate aspartate transporter), EAAT2/GLT-1 (Glutamate transporter 1), EAAT3/EAAC1 (Excitatory aminoacid carrier 1). Mientras que los transportadores GLAST y GLT-1 se encuentran en las células gliales, el transportador EAAC1 se encuentra en las neuronas. Se ha descrito una isoforma del transportador GLT-1, GLT-1a en las terminales sinápticas del hipocampo (Chen et al., 2004). También se han identificado otros transportadores de glutamato con una distribución restringida al cerebelo, el EAAT4 y a la retina, el EAAT5 (Danbolt, 2001). De acuerdo con estudios realizados en animales *knock-out* de los transportadores de glutamato, se ha descrito que los transportadores localizados en las células gliales son los principales reguladores de la concentración extracelular del neurotransmisor, mientras que el transportador neuronal está asociado a otras funciones como el transporte de cisteína para la síntesis de glutatión, entre otras (Rothstein et al., 1996; Chen y Swanson, 2003).

Por otra parte, se ha descrito que los transportadores de glutamato están asociados a una corriente de cloro. De acuerdo a su permeabilidad a este anión se pueden ordenar de mayor a menor de la siguiente manera: EAAT4/5>GLAST>EAAC1>>GLT-1. El flujo de cloro ocurre en presencia del ligando, sin embargo el transporte de glutamato es independiente de éste. Por lo tanto se ha sugerido que los transportadores de glutamato tienen una estructura que puede funcionar como canal. Dado que los transportadores de glutamato se han localizado en sitios postsinápticos, se cree que a través de la conductancia de cloro, estos transportadores podrían ejercer una función reguladora de la excitabilidad en estos sitios (Kanai et al., 2002).

A partir de la cristalografía del transportador de glutamato homólogo de la bacteria *Pyrococcus horikoshii* se conoce la estructura molecular de estas proteínas (Yernool et al., 2004). De acuerdo con el cristal, el transportador es un trímero que se encuentra embebido en la membrana plasmática, que en la cara extracelular forma una estructura semejante a una vasija, en la que se unen dos iones Na^{2+} y una molécula de glutamato (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007). Después de la unión de los

substratos, el transportador los internaliza mientras que se extruye un ion K^+ (Watzke et al., 2001).

El transporte de glutamato depende del gradiente de sodio generado por la ATPasa sodio/potasio, ya que la unión del glutamato a su transportador depende de la unión de los iones Na^{2+} . Por otra parte, dado que el transporte de glutamato induce un aumento en la concentración intracelular de sodio, se ha sugerido que el transporte de glutamato estimula la actividad de la ATPasa, permitiendo la restauración del gradiente iónico transmembranal. Una vez dentro de las células gliales, el glutamato es metabolizado a glutamina a través de su reacción con el amonio. Esta reacción la lleva a cabo la glutamina sintetasa que únicamente se encuentra en los astrocitos y oligodendrocitos pero no en las neuronas. Posteriormente, la gln se libera al espacio sináptico dónde será capturada por las terminales nerviosas para sintetizar glutamato a través de la glutaminasa activada por fosfatos (GAF) dentro de la mitocondria. A este ciclo se le conoce como el “ciclo del glutamato-glutamina”, en el que además de formarse el precursor del glutamato, se elimina el amonio que se encuentra libre, cuya acumulación puede afectar la homeostasis celular y así a la transmisión sináptica (Figura 2).

El correcto funcionamiento de los componentes de la neurotransmisión glutamatérgica es determinante para mantener una buena transmisión excitadora. La falla en alguno de sus elementos, ya sea en los receptores o los transportadores, puede dar lugar a un proceso de muerte neuronal denominado excitotoxicidad, que se describe a continuación.

❖ Muerte neuronal excitotóxica y excitotoxicidad secundaria

La muerte neuronal que involucra la toxicidad del glutamato o excitotoxicidad se caracteriza por la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos y la entrada masiva de calcio a la neurona. Ésta puede ocurrir por la acumulación del neurotransmisor en el espacio sináptico a consecuencia de la alteración en la recaptura del glutamato. La entrada de calcio es un factor determinante en la excitotoxicidad, pues la acumulación de este catión al interior de la neurona activará proteasas, endonucleasas y fosfolipasas cuyo blanco son componentes estructurales de la neurona. Asimismo, la sobrecarga de calcio alterará la homeostasis mitocondrial, ya que este organelo acumulará calcio, afectando la síntesis de ATP y facilitando la producción de

especies reactivas de oxígeno, que contribuirán al estrés oxidativo, otro factor involucrado en la excitotoxicidad. Los mecanismos celulares que requieren de ATP se verán comprometidos, entre éstos los sistemas encargados de regular la concentración de calcio intracelular como ATPasas y transportadores, contribuyendo a la acumulación del catión. Por otra parte, además de las especies oxidantes producidas por la falla mitocondrial, el calcio activará a enzimas generadoras de especies reactivas como la xantina oxidasa y la óxido nítrico sintasa, contribuyendo al daño oxidativo. En conjunto, las alteraciones generadas por la entrada masiva de calcio afectarán diferentes componentes de la neurona, conduciéndola a la muerte (Figura 3).

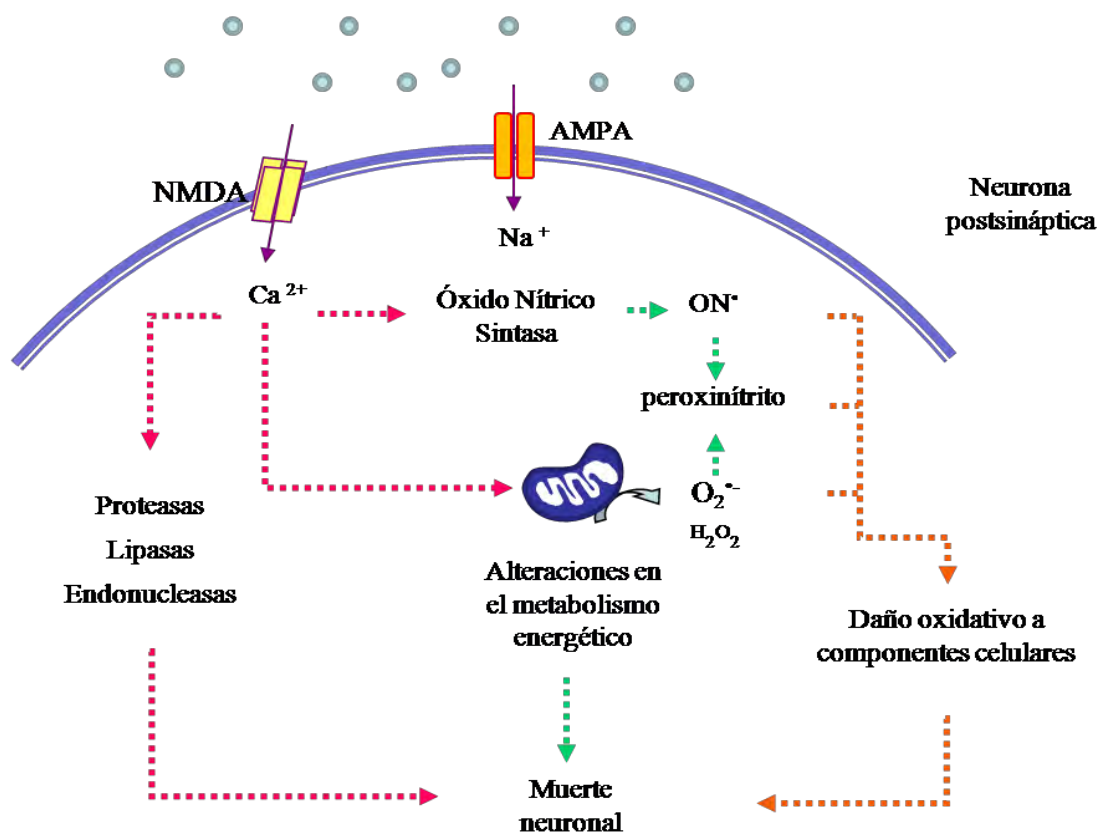


Figura 3. Muerte neuronal excitotóxica. La entrada de calcio por la activación prolongada de los receptores NMDA es un factor determinante en el proceso excitotóxico. El calcio inducirá la activación de enzimas que degradarán o dañarán componentes estructurales de la neurona, así como enzimas generadoras de especies reactivas como la óxido nítrico sintasa. Asimismo, el calcio desestabilizará la función mitocondrial alterando la producción de ATP y promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, cuyo blanco son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La convergencia de estos eventos culmina con la muerte de la neurona. (Estrada-Sánchez et al., 2008).

La muerte neuronal excitotóxica también puede ocurrir bajo condiciones de deficiencia energética, aún a concentraciones fisiológicas de glutamato. A este tipo de

muerte se le denomina excitotoxicidad secundaria y ocurre por la activación de los receptores a NMDA. La falta de ATP limitará la restauración de los gradientes iónicos de la neurona, manteniendo despolarizada a la membrana. En condiciones fisiológicas, el receptor NMDA se encuentra bloqueado de manera dependiente del voltaje por un magnesio presente en el canal, y aún cuando se encuentren unidos el glutamato y la glicina, el receptor no se activará si no se retira el magnesio del poro. La despolarización parcial de la membrana plasmática, liberará al receptor NMDA del bloqueo por el magnesio, ya que es dependiente del voltaje, facilitando la activación del receptor. Esencialmente la cascada de eventos que culmina con la muerte de la neurona es la misma que se describió anteriormente, en la que la concentración de calcio es un factor determinante.

De acuerdo con estudios previos de nuestro y otros laboratorios, se ha descrito una estrecha relación entre la excitotoxicidad y la deficiencia energética. De hecho la toxicidad del glutamato se facilita en condiciones de inhibición glucolítica o mitocondrial tanto *in vivo* como *in vitro* (Novelli et al., 1988; Greene et al., 1998; Massieu et al., 2000; Del Río et al., 2007; Mejía-Toiber et al., 2006). Esto es relevante en la neuropatología de algunos desórdenes neurológicos o enfermedades neurodegenerativas que involucran un componente excitotóxico. En el caso de la EH, los estudios en pacientes y modelos transgénicos han descrito alteraciones en componentes de la transmisión glutamatérgica, tanto a nivel de sus receptores como de sus transportadores, así como en el metabolismo energético. Dichas alteraciones pueden facilitar la muerte neuronal excitotóxica, sugiriendo la participación de la excitotoxicidad en la patogénesis de la EH.

En la siguiente sección se presentará evidencia que apoya esta hipótesis.

❖ **Excitotoxicidad en la patogénesis de la EH**

La muerte neuronal excitotóxica se ha asociado con la pérdida de las NEM en la EH, debido a que estas neuronas reciben proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza motora, y además son selectivamente vulnerables a la toxicidad mediada por los análogos del glutamato *in vivo*. La administración de ácido quinolínico, NMDA o el mismo glutamato en el estriado de ratas, produce muerte neuronal selectiva, semejante a lo observado en cerebros *post mortem* de la EH (McGeer y McGeer, 1976; Schwarcz y Coyle, 1977; Schwarcz et al., 1984). También se ha descrito en cerebros

post mortem una disminución en la unión del glutamato a sus receptores en el estriado, así como una reducción del mRNA de las subunidades NR1 y NR2, lo que sugiere la pérdida de las neuronas que contienen receptores NMDA en esta región (Albin et al., 1990; Arzberger et al., 1997). Más recientemente se observó que la expresión diferencial de los genes del receptor NMDA contribuye a la variabilidad clínica de la EH. Es decir, que dependiendo de la variante del gen NR2B y NR2A que se exprese, la edad de inicio de la enfermedad puede variar hasta en 2.8 años, sugiriendo un papel de estos receptores en la alteración sináptica y probablemente con la pérdida de las NEM en la EH (Arning et al., 2005; Arning et al., 2007). Por otra parte, la administración de antagonistas de los receptores NMDA como la memantina y la amantadina, disminuye la progresión de la enfermedad (Beister et al., 2004; Lucetti et al., 2002). Estos antecedentes apoyan el papel de la excitotoxicidad en la EH, que también se sustenta por los estudios de cerebros *post mortem* y modelos transgénicos que indican que la expresión de la mhtt conduce a la alteración de la transmisión glutamatérgica. A continuación se describen detalladamente las alteraciones observadas en los receptores y transportadores del glutamato en pacientes y modelos animales de la EH.

Alteraciones en los receptores de glutamato asociados a la EH

A partir de estudios realizados en tejido *post mortem* y modelos transgénicos de la EH se han identificado alteraciones tanto en receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato. Se ha reportado que polimorfismos del gen de la subunidad GluR6 del receptor a kainato están asociados con la manifestación temprana de la enfermedad (Rubinsztein et al., 1997; MacDonald et al., 1999). Sin embargo, el papel de las subunidades de los receptores AMPA/kainato en la vulnerabilidad de las NEM no se ha estudiado a detalle. Por otra parte, la participación de los mGluR en la progresión de la enfermedad se ha sugerido a partir de la administración del inhibidor del receptor mGluR5, 2-metil-6-(feniletinil)-piridina (MPEP) en el ratón R6/2 (Schiefer et al., 2004), ya que la administración de este antagonista prolonga el periodo de vida del ratón R6/2 y mejora su desempeño en algunas pruebas conductuales. Lo que sugiere el papel de los mGluR en la vulnerabilidad de las NEM en la EH. En este sentido, se ha descrito que la mhtt puede afectar la cascada de señalamiento relacionada con los mGluR1 y mGluR5, que están asociados con la producción de DAG e IP₃. La HAP1A (huntingtin associated protein-1A) y el receptor a IP₃ forman un complejo proteico que en presencia de la mhtt produce una mayor liberación de calcio del retículo endoplásmico (Tang et al., 2004). Lo anterior sugiere que los receptores

mGluR pueden estar involucrados en la patogénesis de la EH, posiblemente contribuyendo al desarrollo de un evento excitotóxico.

La combinación de las subunidades del receptor NMDA confiere propiedades funcionales particulares. Los estudios enfocados en evaluar los cambios en la expresión de las subunidades que componen al receptor NMDA en el modelo R6/2 son diversos, sin embargo la mayoría describen que no hay cambios, o que hay una disminución discreta en los niveles de mRNA de las subunidades NR1, NR2A y NR2B (Luthi-Carter et al., 2003; Ali et al., 2006; Li et al., 2003). A nivel de proteína se ha descrito disminución de estas tres subunidades, sin embargo los cambios descritos en el estriado no son significativos (Li et al., 2003). De manera similar, en el ratón YAC72 (con 72 repetidos de gln) no se encontraron cambios en las subunidades NR1 y NR2B en el estriado, respecto los niveles presentes en el ratón YAC48 (con 48 residuos de gln), sin embargo, en el ratón YAC128 (con 128 repetidos de gln) sí se observó una disminución significativa en la subunidad NR2B (Cepeda et al., 2001).

También se han descrito algunas alteraciones en las propiedades de los receptores, relacionadas con la combinación de las subunidades presentes en los modelos transgénicos, como es una disminución en el bloqueo de los receptores NMDA por magnesio, en el estriado del ratón R6/2 (Starling, 2005). En este sentido, la expresión *in vitro* de la combinación de las subunidades NR1/NR2B en células que expresan a la mhTt, muestran una corriente de activación mayor al estimular a los receptores NMDA (Chen et al., 1999; Zeron et al., 2001). Resultados similares se describieron en rebanadas de estriado de los ratones R6/2 y YAC, donde la corriente de activación del receptor NMDA es de mayor amplitud respecto a la obtenida en los animales silvestres (Cepeda et al., 2001). Con base en lo anterior, se ha sugerido que la expresión de la mhTt facilita la cadena excitotóxica debido a alteraciones en las propiedades de los receptores NMDA, que favorecerían una mayor activación. De hecho, el aumento de la corriente entrante del receptor NMDA, correlaciona con un incremento en la concentración de calcio intracelular y la presencia de muerte neuronal en el ratón YAC (Zeron et al., 2002). Resultados similares se han descrito en cultivos primarios del estriado de este modelo (Zeron et al., 2001; Tang et al., 2005).

Por otra parte, a pesar de que el modelo YAC72 es vulnerable a la toxicidad mediada por la activación del receptor NMDA tanto *in vivo* como *in vitro*, la administración intraestriatal del ácido quinolínico produce una lesión más extensa en los animales silvestres que en los transgénicos R6 (R6/2 y R6/1) (Hanson et al., 1999; MacGibbon et al., 2002). De manera similar, la administración intraperitoneal del

ácido kaínico no genera crisis epilépticas ni muerte neuronal en estos animales, contrario a lo que se observa en los animales silvestres (Morton et al., 2000). Por otra parte, cultivos primarios de la corteza cerebral del modelo *knock-in* HdhQ111 y del R6/2 muestran la misma vulnerabilidad a la toxicidad del NMDA que los cultivos control (Snider et al., 2003). La discrepancia entre los resultados encontrados en los ratones YAC y los R6 puede deberse al fondo genético de cada uno, o a la edad de los animales en la que se realizó el estudio. Generalmente, los estudios enfocados en evaluar la vulnerabilidad a la excitotoxicidad en el modelo R6/2 se han realizado a las 10 semanas de edad, cuando el fenotipo de la enfermedad es evidente pero no abrupto. En este sentido, un estudio reciente en el modelo YAC 128 revela que la sensibilidad a la toxicidad del ácido quinolínico, depende de la edad del ratón. En etapas tempranas (1.5-2 meses de edad) la inyección del ácido quinolínico induce una lesión extensa en el estriado, sin embargo a los 10 meses de edad, cuando los signos de la enfermedad son muy evidentes, los ratones son altamente resistentes a la toxicidad del ácido quinolínico (Graham et al., 2009).

Estas observaciones, indican que aún cuando los modelos transgénicos desarrollan alteraciones en el receptor NMDA, no hay una correlación directa entre las alteraciones de este receptor y la manifestación de la cascada excitotóxica.

Papel de los transportadores de glutamato en la patogénesis de la EH

El papel de los transportadores de glutamato se sugirió a partir de estudios en cerebros *post mortem* de pacientes con la EH, en los que se describió una disminución en los sitios de unión de alta afinidad a glutamato y en el mRNA del transportador GLT-1 (Cross et al., 1986; Arzberger et al., 1997). Posteriormente se observó que la captura de [³H]-glutamato en proteolipasomas que contienen a los transportadores provenientes de la corteza prefrontal de pacientes con la EH, presentan una disminución en la captura del aminoácido del 43%, respecto al control (Hassel et al., 2008). Se han descrito resultados similares en el modelo transgénico R6/2. La reducción en los niveles del mRNA del GLT-1 se ha observado a partir de la sexta semana de edad en el ratón R6/2, mientras que la disminución en la proteína se observa hasta la semana 12 (Behrens et al., 2002; Liévens et al., 2001; Shin et al., 2005). Asimismo, la captura del glutamato en el estriado y la corteza cerebral R6/2 está disminuída en estos animales (Nicnicocail et al., 2001; Shin et al., 2005). Por otra parte, la sobre-expresión del transportador GLT-1 en el ratón R6/2 reduce algunas alteraciones motoras e incrementa de manera significativa el periodo de vida de los

animales (Miller et al., 2008). Los estudios mencionados sugieren una relación entre la expresión de la mhtt y alteraciones en el sistema de recaptura del glutamato en el estriado; también sugieren su posible contribución a la neurodegeneración de las NEM en la enfermedad. Sin embargo, aún no es claro el papel de estas alteraciones en la patogénesis de la EH. Por lo cual uno de los objetivos del presente trabajo es evaluar si hay una relación entre el contenido de los transportadores de glutamato y la vulnerabilidad del estriado a la excitotoxicidad en el ratón R6/2.

Relación entre la excitotoxicidad y el metabolismo energético en la EH

Como se mencionó anteriormente, la muerte neuronal excitotóxica es un proceso estrechamente relacionado con el estado energético neuronal, y en la EH se han descrito diversas alteraciones metabólicas. En pacientes presintomáticos y sintomáticos se ha descrito una disminución en la captura y el metabolismo de la glucosa (Kuhl et al., 1982; Kuwert et al., 1990). En este sentido, concentraciones elevadas de lactato se han reportado en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes, sugiriendo un metabolismo oxidativo deficiente de la glucosa (Jenkins et al., 1998), lo cual correlaciona con la disminución de la actividad de los complejos mitocondriales II, III, IV en tejido *post mortem* de los pacientes con EH (Browne et al., 1997).

Aún se desconoce cómo la expresión de la mhtt conduce a alteraciones en la función mitocondrial, pero se ha observado a la mhtt asociada a la membrana externa mitocondrial (Panov et al., 2002; Goebel et al., 1978; Yu et al., 2003; Choo et al., 2004). Más recientemente se ha sugerido el papel de PGC-1 α (por su nombre en inglés peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha) en las alteraciones mitocondriales. Esta proteína es un factor de transcripción asociado con la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. Una disminución de los niveles del mRNA de PGC-1 α y de la transcripción de proteínas asociadas con ésta se han descrito en pacientes y animales transgénicos (Kelly et al., 2004; Cui et al., 2006; Weydt et al., 2006; St. Pierre et al., 2006; McGill et al., 2006). Estas observaciones sugieren que la falla mitocondrial puede estar involucrada en la patogénesis de la enfermedad, ya que dichas alteraciones se observan incluso antes de la presencia del fenotipo, tanto en pacientes como en modelos transgénicos (Browne y Beal, 2004). Sin embargo, la vulnerabilidad del modelo R6/2 a la toxicidad del inhibidor mitocondrial, 3-NP (inhibidor del complejo II de la cadena transportadora de electrones), ha arrojado datos contradictorios. Mientras Bogdanov et al., (1998)

observaron una mayor vulnerabilidad al daño producido por el 3-NP en el modelo R6/2, Hickey y Morton (2000) reportaron que los ratones transgénicos R6/2 son igualmente vulnerables al tratamiento con 3-NP, aún cuando el protocolo de administración de la toxina es similar en ambos estudios.

Por otra parte, alteraciones en la vía glucolítica también podrían estar asociadas a la enfermedad. En pacientes presintomáticos se ha observado una reducción en la tasa metabólica de consumo de la glucosa, sugiriendo una alteraciones en la vía glucolítica, la cual se restringe a las regiones más afectadas en la enfermedad (Powers et al., 2007). Asimismo, se ha observado una disminución discreta de la actividad de la enzima glucolítica, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en tejido *post mortem* (Kish et al., 1998), y bajo condiciones de estrés metabólico, se ha observado una disminución en la actividad de la GAPDH en fibroblastos de pacientes con la EH (Cooper et al., 1998). Estas alteraciones podrían explicarse por una asociación directa entre la mhtt y la GAPDH, ya que en estudios realizados en tejido *post mortem* así como en modelos transgénicos de la enfermedad, reportaron que la mhtt se asocia con la GAPDH (Burke et al., 1996). Por otra parte, la relación entre la disminución de la actividad de la GAPDH y la vulnerabilidad de las NEM al daño, no se ha estudiado. Es posible que una disminución de la actividad de la GAPDH pueda contribuir a la deficiencia metabólica descrita en la EH, y posiblemente a la manifestación la cadena excitotóxica.

De acuerdo con estudios previos, sabemos que la inhibición sostenida de la GAPDH, inducida por el inhibidor irreversible, yodoacetato (IOA), exagera la vulnerabilidad de las neuronas a la toxicidad del glutamato en el hipocampo (Massieu et al., 2000; Massieu et al., 2003) y en el estriado de la rata *in vivo* (Mejía-Toiber et al., 2006). También sabemos que el efecto facilitador de la inhibición glucolítica está asociado con la falla de los transportadores de glutamato, ya que el tratamiento con IOA induce un aumento progresivo de los niveles extracelulares glutamato en el hipocampo, que correlaciona con una disminución en los niveles del transportador GLT-1 y en la captura de glutamato (Camacho et al., 2007). Por lo tanto es posible que una falla moderada pero continua del metabolismo glucolítico facilite la muerte excitotóxica debido a alteraciones del sistema de remoción del glutamato.

Excitotoxicidad, deficiencia energética y daño oxidativo en la EH

Las observaciones descritas en los párrafos anteriores, sugieren que la excitotoxicidad y la deficiencia energética están asociadas con la vulnerabilidad de las

NEM a la muerte en la EH. La producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno es un factor fuertemente asociado con la excitotoxicidad que contribuye al daño neuronal. De aquí que un mecanismo excitotóxico, posiblemente facilitado por la falla metabólica y asociado con el daño oxidativo, es un componente asociado con la pérdida de las NEM en la EH. En el apéndice se incluyen el artículo de revisión titulado: **Excitotoxic neuronal death in the pathogenesis of Huntington's disease** y el capítulo de libro titulado: **“Role of oxidative stress in the pathogenesis of Huntington's disease”**, en los cuales se revisa el papel de la excitotoxicidad y del estrés oxidativo en la patogénesis de la EH.

➤ **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La muerte neuronal excitotóxica se ha asociado con la pérdida de las NEM en la EH. De acuerdo con estudios realizados en pacientes y en modelos transgénicos de la enfermedad, la expresión de la mhtt está asociada con alteraciones en los receptores NMDA y en los transportadores de glutamato, que pueden conducir a la muerte excitotóxica. El papel de los receptores NMDA en el daño neuronal en la EH se ha investigado en parte, a través de la administración de agonistas de este receptor en el estriado de animales transgénicos que modelan la EH, incluyendo los ratones R6/2. Los resultados de estos estudios indican que los ratones R6/2 son igualmente vulnerables a la toxicidad de los agonistas de los receptores NMDA (NMDA y ácido quinolínico), que los ratones silvestres. Sin embargo, a la fecha los efectos tóxicos del glutamato, que es el neurotransmisor endógeno, no se han estudiado en ninguno de los modelos transgénicos. A pesar de que se conoce que existe una disminución en el contenido del transportador GLT-1 y en la captura de glutamato, tanto en pacientes como en animales transgénicos de la enfermedad, a la fecha no se ha estudiado la relación entre el transporte de glutamato y la toxicidad del mismo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer si los ratones de la línea R6/2, que contienen la htt mutada son vulnerables a la toxicidad del glutamato en el estriado, y si dicha vulnerabilidad se asocia con la disminución de los transportadores gliales, GLT-1 y GLAST. Es importante evaluar la toxicidad del glutamato ya éste activará no sólo a los receptores de tipo NMDA sino también a los ionotrópicos de tipo AMPA/kainato y a los metabotrópicos. Además, existiendo una posible disminución en su recaptura se prolongará su acción sobre los diferentes tipos de receptores pudiendo dar lugar a la muerte de las neuronas.

Un segundo objetivo de esta tesis es demostrar si existe una correlación entre la falla en el metabolismo glucolítico y la toxicidad del glutamato en los ratones de la línea R6/2. Con base a estudios previos de nuestro laboratorio sabemos que la inhibición de la enzima glucolítica, GAPDH, promueve la disminución del transportador GLT-1 y facilita la toxicidad del glutamato en el estriado y el hipocampo de la rata (Massieu et al., 2000; Massieu et al., 2003; Mejía-Toiber et al., 2006). Decidimos entonces evaluar si en los ratones R6/2 ocurre dicha facilitación y si ésta se asocia con la disminución en los transportadores GLT-1 y GLAST. A la fecha, el papel del metabolismo glucolítico sobre la vulnerabilidad a la excitotoxicidad de las NEM no se ha estudiado en la EH, por lo que los resultados de este estudio aportarán

datos nuevos. De aquí que se evaluó la toxicidad del glutamato en el estriado de los ratones R6/2 y silvestres después de un tratamiento con el IOA, inhibidor de la GAPDH, a las 10 semanas de edad cuando de acuerdo con los resultados del primer estudio de esta tesis, los ratones no son vulnerables a la toxicidad del glutamato, ni presentan cambios en el contenido de GLT-1 y GLAST.

➤ **HIPÓTESIS**

Los ratones R6/2 son más vulnerables a la toxicidad del glutamato que los ratones silvestres, la cual estará relacionada con una disminución en el contenido de los transportadores GLT-1 y GLAST.

La inhibición de la vía glucolítica facilitará la toxicidad del glutamato en el estriado del ratón R6/2. Dicho efecto estará asociado con una disminución del contenido de los transportadores GLT-1 y GLAST.

➤ **OBJETIVOS**

1. Evaluar en los ratones silvestres y transgénicos:

- El efecto tóxico del glutamato administrado directamente en el estriado a las 10 y 14 semanas de edad.
- Los niveles de proteína de los transportadores GLAST y GLT-1 en el estriado y la corteza cerebral de ratones de 10 y 14 semanas edad.
- Los cambios en la actividad eléctrica cerebral después de la inyección de glutamato (14 semanas de edad).

2. Conocer el efecto de la inhibición de la GAPDH con el IOA, en ratones albinos de la cepa CD1, y en ratones silvestres y transgénicos R6/2 de 10 semanas, sobre:

- La actividad de la GAPDH en el estriado, corteza cerebral e hipocampo (únicamente en los ratones silvestres y R6/2).
- El efecto tóxico del glutamato administrado en el estriado después del tratamiento con IOA.
- Los niveles de proteína de los transportadores de glutamato en el estriado y la corteza cerebral después del tratamiento con IOA.

Este estudio se llevó a cabo primero en los ratones albinos y silvestres para establecer la dosis y el protocolo de administración de IOA adecuados para producir la inhibición de la GAPDH en el cerebro. También se realizó para conocer las dosis tóxicas de glutamato inyectado en el estriado de estos ratones. Este último nos permitió establecer una dosis tóxica de glutamato, lo cual era necesario también para cumplir con el primer objetivo de la tesis.

➤ MÉTODOS

Modelo transgénico R6/2 e identificación del genotipo a través de PCR

Se estableció una colonia de ratones transgénicos R6/2 en el vivario del Instituto de Fisiología Celular a partir de hembras silvestres (B6CBA) trasplantadas con ovarios de hembras transgénicas que se obtuvieron de “The Jackson Laboratory” (Bar Harbor, ME, USA). Los animales se mantuvieron a 20-22°C con un ciclo luz oscuridad de 12 horas. La identificación de los animales transgénicos se realizó a través de un ensayo de PCR en muestras de DNA obtenido de la oreja. Esta técnica se estableció con base en la metodología previamente descrita por Segovia, 2002. Las muestras se incubaron por 1 hora a 60° C con proteinasa K (1.68 U por muestra) en una solución amortiguadora preparado con sacarosa 0.32 M, Tris-HCl 0.010 M pH 7.5, MgCl₂ 0.005 M y Triton X-100 1% v/v. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 45 µl conteniendo: 1 µl de DNA, 5% v/v DMSO, 29.2 µl agua estéril, 5 µl MgCl (10 mM), 1 µl dNTP's, 2 µl (10 µM) de cada uno de los dos primers usados: HUN 3 (5'-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-3') y HUN 5 (5'-CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTG-3') (Mangiarini et al., 1996) y 5 µl del buffer para PCR con 1 µl de la Taq-polimerasa. El fragmento se amplificó con las siguientes condiciones de temperatura: 94° C a 3 min para la desnaturalización del DNA, posteriormente se dieron 49 ciclos de 95° C por 30 s, 68° C por 30 s, y 72° C por 40 s, y una temperatura final de elongación de 72° C por 10 min. La identificación de los fragmentos se realizó en geles de agarosa al 4.5% con 0.1 µg/µl de bromuro de etidio.

Inyección intraestriatal de glutamato

Con el fin de seleccionar la dosis tóxica de glutamato en el estriado del ratón, se utilizaron ratones albinos de la cepa CD1 y ratones silvestres B6CBA, los cuales se inyectaron con diferentes concentraciones de glutamato (300, 400 y 500 nmol/0.5 µl). Para esto se anestesiaron con una mezcla de halotano 2-3% en 95%O₂/5% CO₂ y los animales se colocaron en un estereotáxico acondicionado para el ratón. Posteriormente se colocó una aguja de inyección en las coordenadas correspondientes al estriado izquierdo: AP +0.8 mm a partir de bregma, L +2.2 de la línea media y V -3.2 de la dura (que se obtuvieron a partir del atlas del cerebro del ratón de Paxinos y Franklin, 2004). Una vez conociendo que 500 nmol/0.5 µl (500 mM) es suficiente para obtener una lesión claramente visible en cortes coronales teñidos con violeta de cresilo, y

cuantificable, se procedió a inyectar hembras silvestres y transgénicas de 10 y 14 semanas de edad. Una solución de glutamato monosódico (500 nmol/0.5 µl; pH 7.0) disuelta en agua estéril se preparó en cada sesión experimental. El glutamato se inyectó a un flujo de 0.175 µl/min; cinco minutos después de haber concluido la inyección se retiró la aguja y se suturó. Los animales se colocaron en una caja con alimento y agua *ad libitum*.

Evaluación histológica: volumen de lesión y Fluoro jade

La lesión producida por la inyección de glutamato se evaluó a las 3 y 24 h después de la cirugía. Bajo anestesia profunda (100 µl de pentobarbital sódico, vía intraperitoneal) los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con 25 ml de NaCl al 0.9% y 35 ml de formaldehído al 3.7% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.3. Los cerebros fueron mantenidos en la misma solución de fijación y después se obtuvieron cortes coronales de 40 µm para la tinción con violeta de cresilo, y cortes de 25 µm para la tinción de Fluoro jade. Posteriormente se tiñeron los cortes con violeta de cresilo lo que permitió identificar el área lesionada, que se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos y la disminución en la población celular. El volumen de lesión se obtuvo a partir de la multiplicación del área lesionada, medida manualmente en cada corte a través del analizador de imágenes NIH Macintosh Image 1.6, por el grosor del corte (40 µm); se cuantificaron todos los cortes que presentaron lesión en el estriado.

Además del análisis con violeta de cresilo, se evaluó el daño celular con la tinción de Fluoro jade que permitió identificar células en proceso de muerte de acuerdo a Schmued y Hopkins (2000). Los cortes coronales de 25 µm se dejaron secar a 50° C durante 25 minutos y se colocaron en alcohol al 80% por 5 minutos. Se retiró la solución y se colocó etanol al 70% durante 2 min. Se lavó con agua y se incubó por 10 minutos en una solución de permanganato de potasio 0.06%. Después se incubó con una solución de Fluoro jade al 0.0004% diluída en ácido acético al 0.1% por 20 minutos. Al finalizar los portaobjetos se colocaron a 50° C durante 10 minutos, se deshidrataron con xileno y se montaron con permount. Las células positivas a Fluoro jade se cuantificaron en tres cortes del estriado: el corte que contenía el sitio de inyección, el corte anterior y el posterior al tracto, que se encuentran a una distancia de 180 µm entre sí. El número total de células positivas a Fluoro jade se cuantificó con el programa de análisis de imágenes Image Pro Plus 6.0. Se midió el área del estriado en

cada una de cortes en los que se realizó la cuantificación; el promedio del área en los ratones silvestres fue de 5.53 y de 4.92 mm² en los ratones transgénicos.

Immunoblots

Los niveles de transportadores de glutamato GLAST y GLT-1 se determinaron en homogenados del estriado y de la corteza cerebral de ratones silvestres y transgénicos de 10 y 14 semanas de edad. El tejido se colocó en una solución amortiguadora de Tris-HCl (25 mM) pH 7.5 (1:10 peso/vol) con EDTA (2mM) e inhibidores de proteasas (Complete Mini), pH 7.5. Las muestras se centrifugaron a 38,000 rpm durante 35 min y los pellets se resuspenden en 180 µl de la misma solución amortiguadora. Quince µg de proteína se utilizaron para el inmunoensayo, con base en curvas de proteína realizadas previamente. Las muestras se hirvieron por 3 min y se corrieron por electroforesis a 25 mAmps durante 2 h para después transferirse a una membrana de PVDF immobilon-P durante 24 h a 4° C. Las membranas se bloquearon por una hora con una solución al 5% de leche descremada en solución de Trizma-base salina/Tween 20 (TBS-T; Trizma Base 0.1 M pH 7.2, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%). La membrana se incubó con un anticuerpo policlonal (anti-guinea pig) contra el transportador GLAST o GLT-1 (dilución 1: 3,000) durante 24 h a 4° C. Posteriormente, las membranas se lavaron (4 veces/10 min) en TBS-T y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario (anti-guinea pig) conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:10,000). Las membranas se lavan (4 veces/10 min) en TBS-T, se incuban con ECLTM y se expusieron a una placa fotográfica por 40 segundos. Los niveles de inmunoreactividad se cuantificaron por densitometría a través del analizador de imágenes ImageJ. Los niveles de proteína de los transportadores fueron reportados en relación a los niveles de β-actina que se usó como control de carga.

Registro encefalográfico

La actividad cerebral se evaluó antes y después de la inyección de glutamato en machos silvestres y transgénicos de 14 semanas de edad. Una semana antes se implantó una cánula guía bajo anestesia (2-3% de halotano en 95%O₂/5% CO₂) en las coordenadas correspondientes al estriado izquierdo: AP +0.8 mm a partir de bregma, L +2.2 de la línea media y V -2 desde la dura (Paxinos y Franklin, 2004). Se colocaron electrodos epidurales en la corteza frontal y parietal de ambos hemisferios que se fijaron al cráneo del ratón con cemento dental. Después de la cirugía los animales

fueron colocados en cajas con alimento y agua *ad libitum*. Una semana después se monitoreó el electroencefalograma basal por 20 minutos con un polígrafo Grass Modelo 79E en animales en libre movimiento antes de la administración de glutamato. Posteriormente se inyectaron 500 nmol de glutamato en 0.5 μ l (a un flujo de 0.175 μ l/min) en el estriado, a través de una aguja de inyección que fue colocada en la cánula guía, y que estaba conectada a una bomba de infusión automática. La actividad eléctrica cerebral fue evaluada inmediatamente después de la inyección de glutamato y durante 2 h después de la inyección. A partir de los registros se obtuvo el promedio de la latencia a la que iniciaron las descargas epilépticas y el tiempo total durante el cual éstas se presentaron (que se evaluó desde el inicio de la actividad hipersincrónica hasta que concluyó la presencia de espigas de gran amplitud). Los animales se sacrificaron 24 h después del registro encefalográfico; el hemisferio izquierdo se fijó por inmersión en paraformaldehído al 3.7 % para la evaluación del volumen de lesión. El hemisferio derecho se procesó para los inmunoensayos como se describió anteriormente.

Inhibición sostenida de la GAPDH

Dado que la inhibición sostenida de la GAPDH después de la administración sistémica del IOA se tenía estandarizada en la rata, decidimos evaluar inicialmente la respuesta de este tratamiento en el ratón albino de la cepa CD1, para la estandarización de la metodología. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con IOA (15 mg/kg/3 días); los grupos control se inyectaron con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM. Dos horas después del tratamiento se obtuvieron homogenados del estriado y la corteza cerebral para la determinación de la actividad de la GAPDH (ver más adelante). Asimismo, se evaluó el curso temporal de la inhibición, para tal motivo estudiamos la actividad de la GAPDH a las 24, 48 y 72 horas posteriores al tratamiento. Una vez establecido el protocolo de inhibición de la GAPDH en los ratones albinos, éste se estableció en ratones silvestres y transgénicos R6/2 de 10 semanas de edad. Dos horas después de la última inyección de IOA se obtuvieron homogenados del estriado, corteza cerebral e hipocampo. Las regiones cerebrales correspondientes al hemisferio derecho se usaron para cuantificar la actividad de la GAPDH y las del hemisferio izquierdo se procesaron para la determinación de los niveles de proteína de los transportadores GLT-1 y GLAST por inmunoensayo (como se describió anteriormente). Los tejidos que se utilizaron para determinar la actividad de la GAPDH se homogenizaron en Tris-HCl 0.1 mM pH 8.5; 100 μ g del homogenado total fue utilizado para cada ensayo. La actividad se monitoreó en una mezcla de

reacción (1 ml volumen final) conteniendo (en mM): 1.7 de arsenato de sodio, 20 de fluoruro de sodio, 1.0 de NAD⁺ y 5 de KH₂PO₄. La reacción se inició añadiendo gliceraldehído-3-fosfato (concentración final 1 mM) a la mezcla de reacción. La actividad de la GAPDH se estimó a partir de la producción de NADH que se detecta a 340 nm durante 30 seg cuando la reacción es lineal, en un espectrofotómetro con una lámpara de luz ultravioleta. La actividad se calculó a partir del delta en la absorbancia obtenida en los primeros 15 segundos. Se utilizó un coeficiente de extinción molar de 2.07 para calcular la cantidad de NADH formado en micromolas. La proteína fue cuantificada a través del método de Bradford (Bradford, 1976). Los datos se expresaron como micromolas de NADH/min/mg de proteína.

El efecto tóxico del glutamato en condiciones de inhibición glucolítica se evaluó en otro grupo de animales tratados con IOA. Dos horas después de la última inyección intraperitoneal de IOA o del vehículo, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de halotano 4-5%. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo descrito para la administración de glutamato. Veinticuatro horas después de la cirugía se sacrificaron los animales y los cerebros fueron procesados para la evaluación histológica descrita anteriormente.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron a través de una ANOVA de una vía. Las diferencias entre los tratamientos se obtuvieron con la prueba pos-hoc de Fisher. Para las diferencias significativas entre los grupos se consideró una $p \leq 0.05$.

➤ **RESULTADOS PRIMERA PARTE**

“Muerte neuronal excitotóxica en el estriado del ratón transgénico R6/2: papel de los transportadores de glutamato y sus cambios asociados con la progresión de la enfermedad”

Los resultados descritos en esta sección se publicaron en:

Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J y Massieu L. Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurobiol Dis* 2009;34:78-86.

Toxicidad del glutamato en el estriado del ratón R6/2

Se inyectaron animales transgénicos y silvestres de 10 semanas de edad con una solución conteniendo glutamato (500 nmol/0.5 µl) o solución salina (0.9%/0.5 µl) en el estriado izquierdo. Veinticuatro horas después de la cirugía se evaluó la lesión en cortes coronales de cerebro a nivel del estriado. De acuerdo con los resultados, los animales silvestres y transgénicos presentaron un volumen de lesión de 0.24 y 0.35 mm³, respectivamente. El volumen de lesión obtenido en ambos grupos es diferente a la lesión producida por la administración del vehículo. Sin embargo, el volumen de lesión producido por el glutamato en los ratones transgénicos no es estadísticamente diferente al volumen de daño obtenido en el grupo de animales silvestres (Figura 4A). El número total de células dañadas se cuantificó a través de la tinción con Fluoro jade, 24 horas después de la administración de glutamato. A pesar de que el grupo de ratones transgénicos presentó un número mayor de células positivas a Fluoro jade respecto a lo obtenido en el grupo silvestre, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 4B). Estos resultados indican que a las 10 semanas de edad la vulnerabilidad del estriado a la toxicidad del glutamato es igual en los ratones silvestres y R6/2.

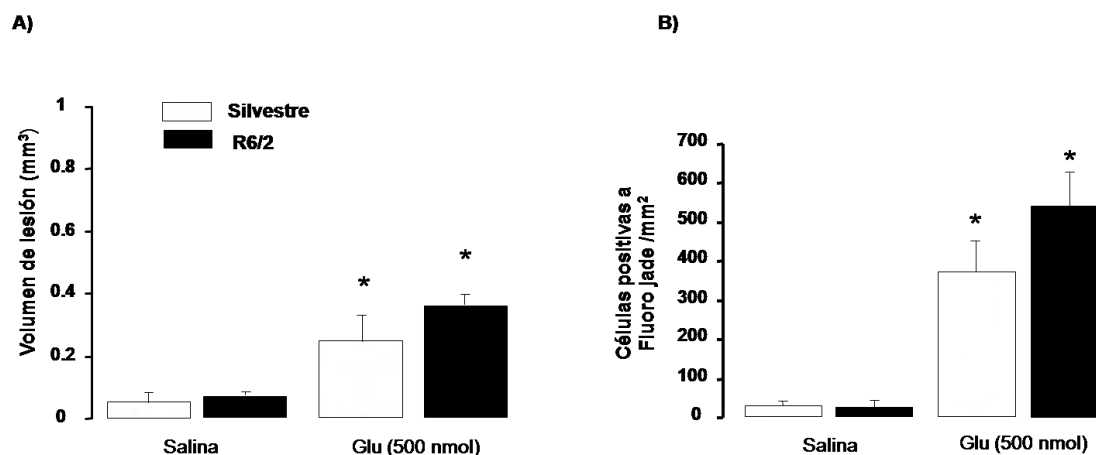


Figura 4. Daño neuronal inducido por glutamato a las 10 semanas de edad en ratones R6/2 y silvestres. A) El volumen de lesión y B) el número de células positivas a Fluoro jade fueron evaluados 24 horas después de la inyección intraestriatal de 500 nmol de glutamato o solución salina. Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar de 3-4 animales por grupo. * $P \leq 0.05$ respecto al resultado obtenido en los animales inyectados con salina.

A continuación se examinó la vulnerabilidad del estriado a la lesión excitotóxica del glutamato en animales de 14 semanas de edad, que ya expresan claramente el fenotipo de la enfermedad. En general, la administración de glutamato en los animales de 14 semanas de edad produjo una lesión mayor a la lesión producida en los animales de 10 semanas tanto en los silvestres como en los transgénicos. Sin embargo, la lesión observada en los animales transgénicos es mayor y estadísticamente diferente respecto a la del grupo silvestre. En la Figura 5 se muestran microfotografías representativas de cortes coronales teñidos con violeta de cresilo y Fluoro jade, obtenidos 24 h después de la administración de glutamato o solución salina. En la Figura 5A se observa que la región lesionada en el estriado de los animales transgénicos es más extensa, así como el área que contiene a las células positivas a Fluoro jade. La cuantificación del volumen de lesión y del número de células marcadas con Fluoro jade se representa en las gráficas de la Figura 5B y C. El volumen de lesión obtenido en los ratones transgénicos a las 24 h después de la cirugía, es 2.1 veces mayor al obtenido en los animales silvestres (0.71 y 0.33 mm³, respectivamente); esta diferencia es estadísticamente significativa. El volumen de lesión también se evaluó a las 3 horas después de la administración de glutamato. A este tiempo, sin embargo, no

se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los animales transgénicos y silvestres (Figura 5B). El número de células dañadas se evaluó a las 3 y 24 horas después de la cirugía. Como se aprecia en la Figura 5C, mientras que a las 3 horas el número de células positivas es similar en el grupo transgénico y silvestre, a las 24 horas el número de células positivas en los ratones transgénicos es el doble al obtenido en los animales silvestres.

Es importante señalar que entre 12-15 minutos después de la administración de glutamato 3 de 4 animales transgénicos presentaron cambios conductuales asociados con hiperexcitabilidad, mientras que los animales silvestres no presentaron esta conducta. Los animales R6/2 presentaron mioclonos, giros contralaterales al sitio de inyección así como la presencia de crisis epilépticas. Debido a esta conducta, se decidió evaluar los cambios en el electroencefalograma (ver más adelante) después de la administración de glutamato.

Niveles de proteína de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST

Los niveles de proteína de los transportadores de glutamato se determinaron por inmunoensayos en el estriado y corteza frontal de animales de 10 y 14 semanas de edad. Como se presenta en la Figura 6A el contenido de GLT-1 en el estriado y la corteza cerebral de los ratones transgénicos es semejante a los niveles presentes en los animales silvestres, a las 10 semanas de edad. Sin embargo a las 14 semanas de edad, en el estriado de los ratones R6/2 se observó una disminución significativa del 46% en los niveles de proteína del GLT-1. Resultados similares se observaron en la corteza cerebral (Figura 6B). Estos resultados concuerdan con reportes previos de otros grupos que reportaron una disminución en los niveles del GLT-1 en el estriado del modelo R6/2 (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Shin et al., 2005). De manera semejante a lo observado con el GLT-1, los ratones transgénicos presentan niveles similares de GLAST en el estriado y la corteza cerebral a las 10 semanas de edad. Sin embargo, a las 14 semanas el estriado y la corteza cerebral de los ratones transgénicos muestran una reducción del 45% en los niveles de GLAST (Figura 7). Estos datos sugieren una correlación entre la vulnerabilidad del estriado a la toxicidad del glutamato y la disminución en el contenido de los transportadores de GLAST y GLT-1 en el modelo transgénico R6/2, que además es dependiente de la edad.

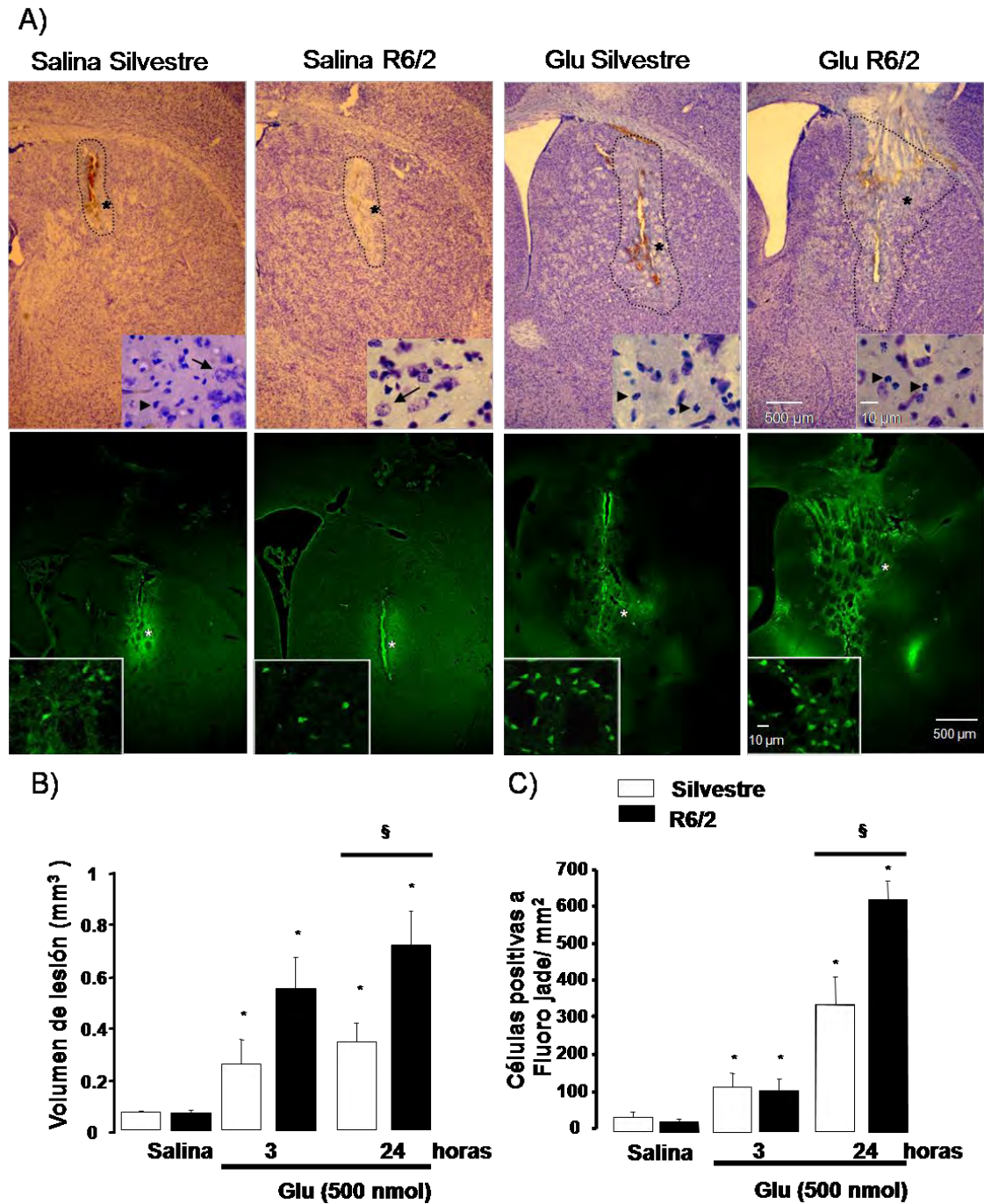


Figura 5. Toxicidad del glutamato en animales de 14 semanas de edad. A) Micrografías representativas de cortes coronales del estriado mostrando la lesión inducida por la inyección de salina o glutamato (500 nmol) en animales silvestres y R6/2, evaluados con la tinción de violeta de cresilo y Fluoro jade, 24 h después de la inyección. Las ampliaciones muestran en detalle la morfología celular dentro del área de lesión (indicado por el asterisco); las flechas muestran células con apariencia normal y las cabezas de flecha señalan células picnóticas. Las ampliaciones en los paneles de Fluoro jade muestran células dañadas. B) Volumen de lesión cuantificado a las 3 y 24 horas después de la administración del vehículo de inyección o del glutamato. C) Número de células positivas a Fluoro jade por mm² evaluadas 3 y 24 horas después de la cirugía. Datos obtenidos de grupos de 3-4 animales, expresados como promedio \pm error estándar. * $P \leq 0.05$ relativo al grupo inyectado con salina, § $P \leq 0.05$ respecto a los animales silvestres. Barra de escala en las ampliaciones = 500 μ m y 10 μ m en los insertos.

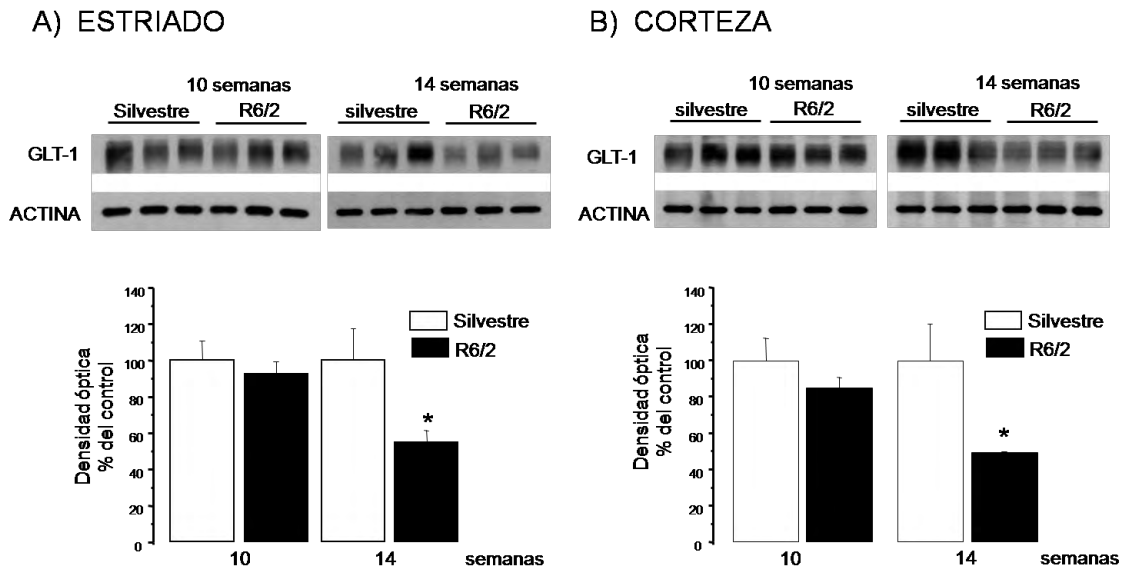


Figura 6. Niveles de proteína del transportador GLT-1 en el estriado (A) y la corteza cerebral (B) de ratones silvestres y transgénicos de 10 y 14 semanas de edad. Se muestra un gel representativo mostrando el contenido de GLT-1 en el estriado (A) y la corteza (B), así como el contenido de β -actina, que se utilizó como control de carga. Las gráficas muestran la cuantificación de la densidad óptica del cociente GLT-1/actina. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de una $n = 3$ por grupo. * $P \leq 0.05$ respecto al grupo silvestre.

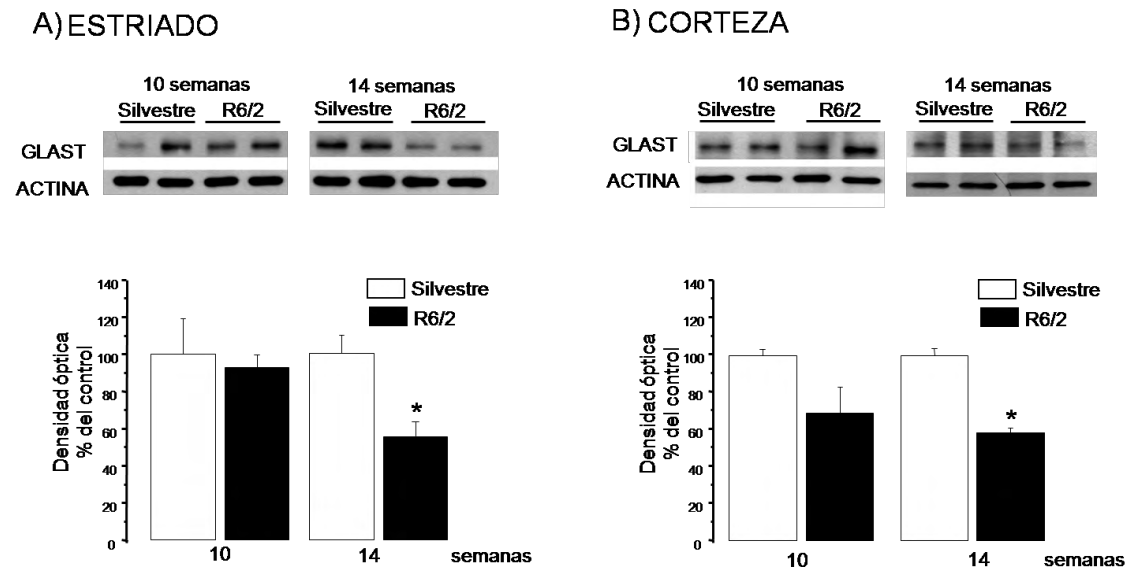


Figura 7. Niveles de proteína del transportador GLAST en el estriado (A) y corteza cerebral (B) de ratones silvestres y R6/2 de 10 y 14 semanas de edad. Se muestran gels representativos señalando los niveles de GLAST en el estriado (A) y la corteza cerebral (B) a las 10 y 14 semanas de edad. Las gráficas muestran el valor obtenido del cociente GLAST/ β -

actina. Los datos son el promedio de 3 animales por grupo que se expresan como promedio \pm error estándar. * $P \leq 0.05$ relativo a los niveles de GLAST obtenidos en los animales silvestres.

Registro electroencefalográfico

La presencia de cambios conductuales asociados con hiperexcitabilidad en los animales transgénicos después de la administración de glutamato, nos llevó a evaluar la actividad eléctrica cerebral a través del registro electroencefalográfico. A las 13 semanas de edad se implantó una cánula guía y una semana después se evaluó el electroencefalograma. La actividad eléctrica basal se monitoreó durante 20 minutos y alrededor de dos horas después de la inyección intraestriatal de glutamato. En la Figura 8 se presenta un registro representativo de un animal silvestre y un ratón transgénico antes y después de la administración de glutamato. Como se puede observar el registro del ratón R6/2 presenta actividad epileptiforme entre los 7 y 15 minutos después de la administración (el promedio de tiempo al que se presentaron estas alteraciones fue 11 ± 1.35 min). Todos los animales transgénicos que se inyectaron con glutamato presentaron alteraciones similares, tanto en el registro electroencefalográfico como a nivel conductual.

La hiperexcitabilidad inducida por la inyección del glutamato se observa en el electroencefalograma como la presencia de descargas epilépticas, caracterizadas por la actividad hipersincrónica y ondas de gran amplitud. Las descargas se originan en el hemisferio ipsilateral y se propagan al hemisferio contralateral. De manera simultánea a la presencia de las descargas, se observaron alteraciones conductuales entre las que se encuentran: crisis epilépticas tónico-clónicas, giros contralaterales a lo largo del eje longitudinal, acicalamiento, y movimientos masticatorios. Las alteraciones en el electroencefalograma duraron entre 62 y 110 minutos (79 ± 11.88 min). Ninguno de los animales silvestres presentó cambios en la actividad electroencefalográfica después de la inyección de glutamato.

Veinticuatro horas después del registro encefalográfico se extrajo el cerebro de los animales; el hemisferio izquierdo se procesó para la evaluación del daño (tinción con violeta de cresilo y Fluoro jade; Figura 8B) y el hemisferio derecho fue usado para la evaluación de los transportadores de glutamato (Figura 9). En la Figura 8B se muestran cortes coronales de cerebro a nivel del estriado en los que se puede observar la extensión de la lesión como una zona pálida en los cortes teñidos con violeta de cresilo y por la presencia de células positivas al Fluoro jade. Estos cortes pertenecen a los animales cuyo registro encefalográfico se muestra en la misma figura.

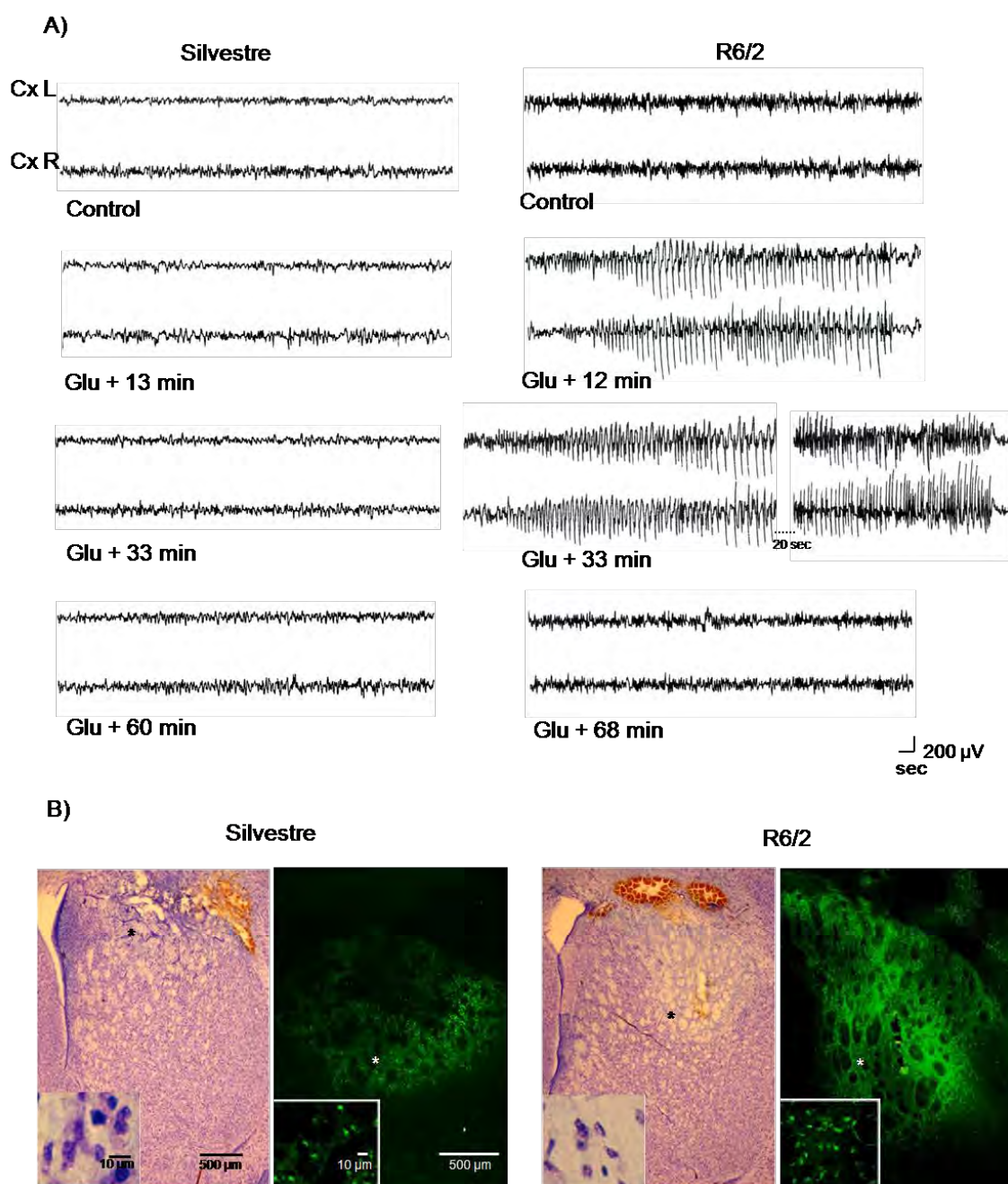


Figura 8. A) Electroencefalograma representativo de un animal silvestre que no mostró cambios en la actividad cerebral, evaluada a diferentes tiempos después de la administración de glutamato. El registro correspondiente al animal transgénico muestra actividad hipsincrónica y ondas con picos de gran amplitud después de la administración de glutamato. B) Cortes coronales teñidos con violeta de cresilo y Fluoro jade de los mismos animales de los que se muestra el electroencefalograma. Se observa la lesión producida por la inyección del glutamato a las 24 horas después. Las ampliaciones muestran la morfología celular dentro del área lesionada.

En este caso las lesiones inducidas por el glutamato fueron 1.6 veces más grandes en los animales transgénicos respecto a la lesión obtenida en los animales

silvestres (volumen de lesión en el grupo silvestre = $1.32 \pm 0.127 \text{ mm}^3$; ratón R6/2 = $2.106 \pm 0.265 \text{ mm}^3$; $p \leq 0.037$, $n=4$), y el área del estriado que contiene células positivas a Fluoro jade es más extensa. La disminución en los niveles de los transportadores GLT-1 y GLAST en el estriado de los animales registrados se corroboró por inmunoensayo (Figura 9).

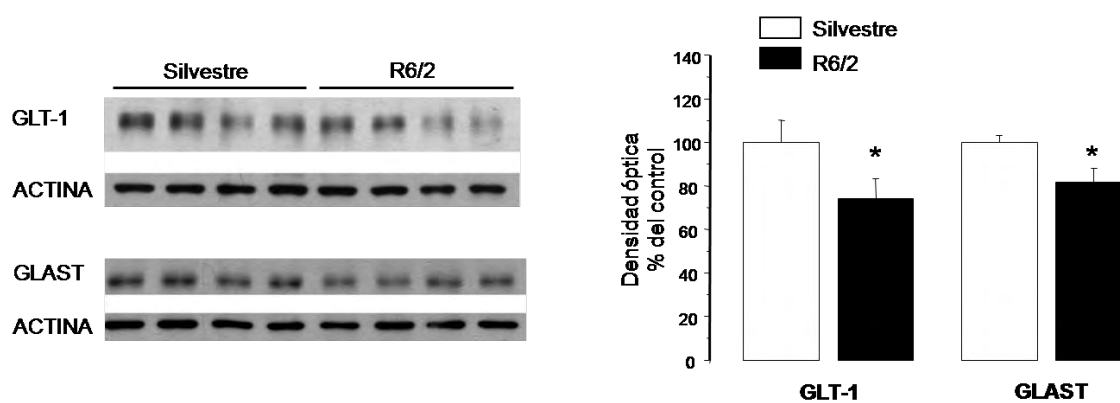


Figura 9. Niveles de proteína de los transportadores GLT-1 y GLAST en el estriado de los ratones silvestres y transgénicos en los que se registraron los cambios en el electroencefalograma después de la inyección del glutamato. Las gráficas muestran el cociente de GLT-1/ β -actina y GLAST/ β -actina. Datos expresados como promedio \pm error estándar, * $P \leq 0.05$ relativo al grupo silvestre.

➤ **DISCUSION PRIMERA PARTE**

El papel de la muerte neuronal excitotóxica en la pérdida de las NEM durante la progresión de la EH se sugirió a partir de modelos experimentales donde se describió que las NEM son altamente vulnerables al daño excitotóxico inducido por la administración intraestriatal de ácido kaínico y de ácido quinolínico (McGeer y McGeer, 1976; Schwarcz et al., 1984). Esta hipótesis se sustentó con el estudio de tejidos *post mortem* y modelos transgénicos, que sugirieron una estrecha relación entre la expresión de la mhtt y la presencia de alteraciones en la transmisión glutamatérgica, que podrían facilitar un proceso excitotóxico. Estas observaciones sugirieron que los modelos transgénicos serían más vulnerables a la muerte excitotóxica.

En el modelo R6/2 la vulnerabilidad del estriado a la excitotoxicidad se evaluó a través de la administración del ácido kaínico y del ácido quinolínico, sin embargo, contrario a lo esperado, el estriado del ratón R6/2 fue igual o menos vulnerable a la toxicidad de los agonistas glutamatérgicos (Morton y Leavens, 2000; Hansson et al., 2001; MacGibbon et al., 2002). Por otra parte, una disminución en el mRNA del transportador GLT-1 se observó en tejidos *post mortem* de pacientes con la EH (Arzberger et al., 1997; Hassel et al., 2008). De manera similar, en el estriado del ratón R6/2 se observó una disminución del mRNA y de la proteína del GLT-1 a partir de las 11 semanas de edad (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2001; Shin et al., 2005). Con base en estos resultados, decidimos estudiar si una disminución en el contenido de los transportadores gliales GLT-1 y GLAST puede estar asociada con la neurodegeneración en la EH. Por lo cual evaluamos la toxicidad del glutamato en el estriado del ratón R6/2 *in vivo*, que al ser el neurotransmisor endógeno, activará a sus diferentes tipos de receptores.

Nuestros resultados demuestran que los ratones transgénicos son más vulnerables a la muerte neuronal mediada por glutamato a las 14 semanas de edad, mientras que a las 10 semanas los ratones responden de manera semejante. La vulnerabilidad a la toxicidad del glutamato correlaciona con la disminución en los transportadores GLAST y GLT-1 en el estriado de los ratones R6/2, que se observa a las 14 semanas pero no a las 10 semanas de edad. Estos resultados sugieren que una alteración progresiva en el sistema de remoción del glutamato ocurre en el modelo R6/2. Posiblemente la reducción en los niveles de la proteína de los transportadores de lugar a que el glutamato inyectado permanezca más tiempo en el espacio sináptico, favoreciendo la activación continua de sus receptores. Esta interpretación concuerda

con los resultados obtenidos en el EEG, mostrando que únicamente los animales transgénicos presentan actividad epileptiforme entre 7 y 15 minutos después de la inyección del glutamato.

El análisis de los niveles de proteínas de los transportadores en los animales registrados, corrobora la relación entre la presencia de una lesión más extensa en los animales transgénicos y la disminución de GLT-1 y GLAST. En conjunto, nuestros resultados sugieren una correlación entre la presencia de daño excitotóxico y la falla en el transporte de glutamato en el modelo transgénico R6/2. En este sentido, recientemente se reportó que la sobre expresión del transportador GLT-1 atenúa las alteraciones fenotípicas del ratón R6/2 (Miller et al., 2008). Asimismo, se observó que la eliminación de las proyecciones glutamatérgicas del estriado provenientes de la corteza motora, disminuye la agregación de la mhtt y la muerte neuronal, e incrementa el periodo de vida del ratón R6/2 (Stack et al., 2007).

Los transportadores de glutamato se encargan de regular la concentración extracelular del neurotransmisor, evitando su acumulación y su efecto tóxico. Nuestros resultados reportan por primera vez una reducción en el contenido de GLAST en el estriado del ratón R6/2. Estudios previos habían demostrado alteraciones en los niveles de GLT-1 a nivel de mRNA y de proteína, pero no se habían detectado cambios en el transportador GLAST (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2001; Shin et al., 2005). Esto se debe a que ningún trabajo había evaluado los cambios en los transportadores a las 14 semanas de edad. Esto sugiere que el modelo R6/2 presenta alteraciones progresivas en el sistema de recaptura del glutamato que inicialmente afecta al GLT-1 y después a GLAST. Esto es de relevancia ya que en el estriado, GLAST es el transportador más abundante (Danbolt, 2001). Es posible que la disminución en los niveles de transportadores de glutamato promueva la acumulación del neurotransmisor. Los niveles de este aminoácido se han estudiado a las 10-12 semanas de edad del ratón R6/2, y de acuerdo con estos trabajos no se han encontrado diferencias en los niveles de glutamato (Behrens et al., 2001; Gianfriddo et al., 2004; Traficante et al., 2007). De acuerdo con nuestros resultados y otros trabajos, a las 10 semanas no hay cambios en los niveles de transportadores GLT-1 y GLAST, y a las 12 semanas se ha reportado una disminución en los niveles del transportador GLT-1. Por ello, es posible que a las 12 semanas el transportador GLAST esté compensando la disminución de GLT-1, manteniendo de esta manera la concentración extracelular de glutamato. A la fecha no se han determinado los niveles extracelulares de glutamato a las 14 semanas de edad; en esta edad es de esperarse un aumento en su concentración

dado que tanto los niveles de GLT-1 como los de GLAST se encuentran disminuídos. En este sentido, resultaría interesante determinar a través de la técnica de microdiálisis los niveles extracelulares de glutamato en el estriado del ratón R6/2 a las 14 semanas de edad cuando hay disminución de ambos transportadores.

La disminución en los niveles de proteína de los transportadores de glutamato que observamos a las 14 semanas de edad, puede deberse a las alteraciones en la expresión de proteínas que se ha descrito en astrocitos que contienen a la mhtt. Se ha observado que la mhtt puede alterar la transcripción de ciertos genes, a través de su interacción directa con promotores y coactivadores (Benn et al., 2008) o a través de secuestrar a factores de transcripción en los agregados intranucleares que se han descrito en neuronas y astrocitos (Shin et al., 2005; Nucifora et al., 2001; Chai et al., 1999). En el modelo de la EH desarrollado en la mosca *Drosophila melanogaster* se ha observado que la presencia de fragmentos de poli-gln altera la vía de transducción del receptor EGF afectando la expresión del transportador de glutamato (Liévens et al., 2005). Sin embargo, aún se desconoce si estas alteraciones ocurren en mamíferos y si están asociadas con la reducción en los transportadores de glutamato.

Por otra parte, estos resultados sugieren que los astrocitos pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la EH. La mhtt también se expresa en los astrocitos (Shin et al., 2005) y las alteraciones generadas por la expresión de esta proteína repercuten en la vulnerabilidad neuronal. Nuestros resultados sugieren que una vía por la que los astrocitos pueden afectar a las neuronas en la EH es a través de la falla en la remoción del glutamato. Es posible que aunado a esto, la expresión de la mhtt genere alteraciones en otras proteínas de los astrocitos que finalmente comprometan la función neuronal. En este sentido, se han descrito alteraciones en el contenido de la glutamina sintetasa, que dentro de los astrocitos se encarga de la síntesis de glutamina a partir del glutamato capturado por los transportadores (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2001). Dado que la función de esta enzima también está involucrada con la regulación de la concentración de amonio, ya que durante la formación de la glutamina éste se usa como donador del grupo amino, es posible que la falla en su actividad pueda estar promoviendo la acumulación del amonio, afectado la homeostasis de la transmisión glutamatérgica.

Por otra parte, una estrategia interesante para investigar si la toxicidad del glutamato se manifiesta cuando hay una disminución en sus transportadores, sería estudiar si la sobreexpresión del GLT-1 inducida por la ceftriaxona puede disminuir los efectos tóxicos del glutamato a las 14 semanas de edad. Previamente se reportó que

este antibiótico puede aumentar los niveles de GLT-1 de manera significativa en el estriado de los ratones R6/2 (Miller et al., 2008), y que este tratamiento prolonga la vida del ratón y reduce la severidad de la manifestación fenotípica.

Previamente se había demostrado que el ratón R6/2 a las 9 semanas de edad, no es vulnerable al daño neuronal y a la inducción de crisis epilépticas generadas por la administración sistémica de ácido kaínico (Morton y Leavens, 2000). De manera similar, ratones R6/2 de 6-12 semanas de edad no son vulnerables a la toxicidad del ácido quinolínico administrado en el estriado (Hansson et al., 2001; MacGibbon et al., 2002). Resultados similares se reportaron en el modelo R6/1 a las 18 semanas de edad (Hansson et al., 1999), que a diferencia del modelo R6/2 expresa un menor número de repeticiones de gln (~115), por lo que la progresión de la enfermedad es más lenta (Hansson et al., 1991; 2001). En contraste con estos trabajos nosotros observamos que el modelo R6/2 es vulnerable a la toxicidad del glutamato. Posiblemente, este resultado se deba a que además de activar al receptor NMDA, el glutamato activa a los receptores de tipo AMPA/kainato y a los metabotrópicos. A partir de estos resultados podemos especular que un papel diferencial de los receptores de glutamato puede estar asociado con su efecto tóxico. En este sentido se observó que el ratón R6/1 a las 18 semanas de edad es vulnerable a la toxicidad mediada por AMPA pero no por el ácido quinolínico (Hansson et al., 2001), sugiriendo el papel de la activación de los receptores AMPA en la muerte neuronal excitotóxica en este modelo. Por lo tanto sería interesante evaluar si los diferentes subtipos de receptores de glutamato tienen un papel diferencial sobre la muerte neuronal inducida por el glutamato a las 14 semanas en el ratón R6/2.

Aún cuando el ratón R6/2 presenta muerte neuronal únicamente en etapas muy avanzadas (16 semanas de edad) de la enfermedad, nuestros resultados demuestran que la administración de glutamato puede precipitar la muerte de las neuronas en el estriado. En pacientes con EH se observan alteraciones metabólicas progresivas en el estriado como es la reducción en la actividad de la aconitasa y de los complejos mitocondriales II/III y IV (Gu et al., 1996; Browne et al., 1997; Browne y Beal, 2006), que pueden predisponer a las neuronas a un estímulo excitotóxico. También se ha descrito la presencia de daño oxidativo en el modelo R6/2 desde las 8 semanas de edad, en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Perluigi et al., 2005; Bogdanov et al., 2001; Browne y Beal, 2006). De manera similar se ha observado que en la línea R6/1 la lipoperoxidación ocurre de manera paralela a la progresión de las alteraciones fenotípicas (Pérez-Severiano et al., 2000). Por lo tanto es posible que las alteraciones

desarrolladas por la expresión de la mhtt no permitan a las neuronas contender contra una activación continua de los receptores glutamatérgicos, inducida por la falla en la remoción del glutamato, dando lugar al desarrollo de la cadena excitotóxica. Es así que la generación progresiva de alteraciones y la reducción en los mecanismos de defensa pueden volver las NEM más vulnerables a la excitotoxicidad. En los pacientes la muerte neuronal ocurre en etapas avanzadas de la enfermedad, entre 5-8 años después de que iniciaron las alteraciones fenotípicas (Vonsattel et al., 1985; Vonsattel y DiFligia, 1998).

Posiblemente en esta fase las neuronas se encuentran severamente afectadas y se vuelvan vulnerables a la toxicidad del glutamato, facilitada por alteraciones en los receptores y transportadores del neurotransmisor. De aquí que sugerimos que muerte excitotóxica puede ser un mecanismo tardío involucrado en la muerte masiva de las NEM en las etapas avanzadas de la enfermedad. El tratamiento con antagonistas de los receptores de glutamato ha mostrado cierta eficiencia en pacientes de la EH, disminuyendo la progresión de la enfermedad (Lucetti et al., 2002; Beister et al., 2004). De aquí que, conocer el momento en que las neuronas se vuelven vulnerables al daño excitotóxico en los pacientes con la EH, ayudaría a diseñar protocolos adecuados de administración de antagonistas de los receptores a glutamato para el tratamiento de la enfermedad.

➤ **RESULTADOS SEGUNDA PARTE**

Estandarización del modelo de estudio: inhibición sostenida de la GAPDH y curva dosis respuesta de la toxicidad del glutamato en condiciones normales y de inhibición glucolítica.

Antes de trabajar con los animales transgénicos, se establecieron las condiciones necesarias para realizar nuestro trabajo experimental. Para esto trabajamos en el ratón albino de la cepa CD1 y los animales silvestres B6CBA, cepa en la cual se generó el modelo transgénico R6/2. Lo primero que evaluamos fue la inhibición y recuperación de la actividad de la GAPDH en el cerebro de animales que recibieron el tratamiento administrado vía intraperitoneal con IOA (15 mg/kg por 3 días). Como se representa en la Figura 10, la actividad de la GAPDH en el estriado (10A) y la corteza cerebral (10B) de ratones CD1 disminuye significativamente. La inhibición persiste hasta las 24 horas posteriores al tratamiento. Sin embargo, la actividad es semejante a la del grupo control a las 48 y 72 horas después del tratamiento. En la corteza cerebral se observa la misma tendencia, sin embargo la inhibición de la GAPDH persiste hasta las 48 horas posteriores al tratamiento y la actividad se recupera a las 72 horas.

Una vez establecido el protocolo de inhibición de la GAPDH, se evaluó la lesión producida por la inyección de glutamato (300, 400 y 500 nmol) o de la salina, en el estriado de ratones albinos en condiciones normales o bajo inhibición glucolítica. Como se observa en la Figura 11, la lesión producida por la inyección de 300 y 400 nmol de glutamato en el grupo control produce una lesión pequeña, que no es diferente de la producida por la inyección de la salina. Sin embargo, en condiciones de inhibición glucolítica la inyección de 300 y 400 nmol de glutamato produce una la lesión más extensa. Por otra parte, la lesión generada por 500 nmol de glutamato es diferente al volumen de lesión producido por la inyección de salina y también es a esta dosis que el efecto potenciador de IOA es más evidente.

Por otra parte, también decidimos evaluar la respuesta de los animales silvestres al tratamiento con IOA y a la toxicidad del ácido glutámico. Aún cuando éstas ya se tenían establecidas en la cepa CD1, desconocíamos si habría una respuesta diferente al ser una cepa distinta. En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos en los ratones silvestres. La actividad de la GAPDH en el estriado (12 A) y la corteza cerebral (12 B) también es sensible a la inhibición inducida por el tratamiento con el IOA en los animales silvestres. En ambas estructuras, la inhibición persiste hasta las 48 horas después de terminado el tratamiento y 72 horas después, la actividad de la

GAPDH es semejante a la del control. Posteriormente, se procedió a evaluar la toxicidad del glutamato en condiciones normales y durante la inhibición glucolítica.

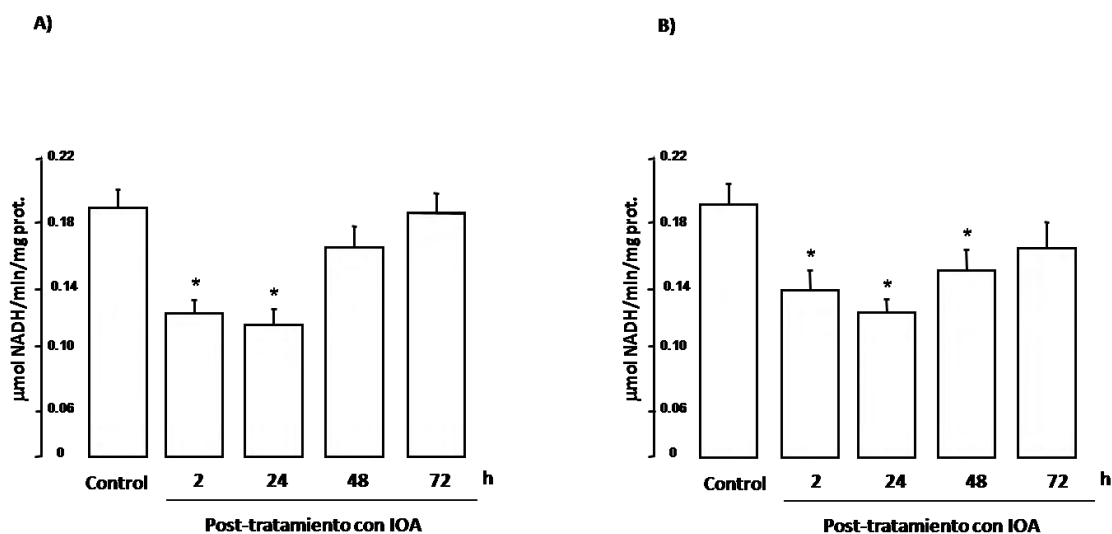


Figura 10. Actividad de la GAPDH en los ratones CD1 y su inhibición a diferentes tiempos posteriores al tratamiento con IOA (15 mg/kg por 3 días) en el estriado (A) y la corteza cerebral (B). La actividad se monitoreó 2, 24, 48 y 72 horas después de la última inyección. En todos los tejidos el IOA inhibe significativamente la actividad (* $P \leq 0.05$) relativo al grupo control. Los resultados se expresan como el promedio de la formación de NADH por minuto por miligramo de proteína \pm error estándar de 4-8 animales por grupo.

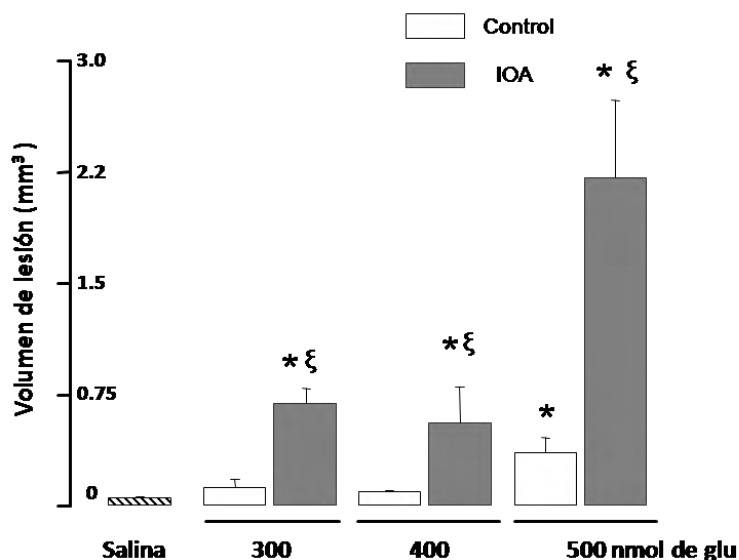


Figura 11. Curva dosis respuesta del volumen de lesión inducido por la administración de 300, 400 ó 500 nmol de glutamato en el estriado de ratones CD1 control o tratados con el inhibidor de la GAPDH. El volumen de lesión se cuantificó 24 horas después de la cirugía. Datos obtenidos de grupos de 3-4 animales, expresados como promedio \pm error estándar. * $P \leq 0.05$ relativo al grupo inyectado con salina, § $P \leq 0.05$ respecto a los animales inyectados con glutamato pertenecientes al grupo control.

En los ratones silvestres, la lesión producida por 300 ó 400 es semejante a la de la salina, y 500 nmol de glutamato producen una lesión estadísticamente mayor respecto a la generada por la salina (Figura 13). Asimismo, la lesión generada por la inyección de 500 nmol durante la inhibición de la GAPDH es mayor. Por lo tanto, la toxicidad del glutamato en los ratones transgénicos se realizó con una dosis de 500 nmol (resultados primera parte). También, esta misma dosis se utilizó para evaluar la vulnerabilidad del estriado a la toxicidad de glutamato en condiciones de inhibición glucolítica (resultados segunda parte), para la cual se utilizó el tratamiento crónico de IOA 15 mg/kg por 3 días.

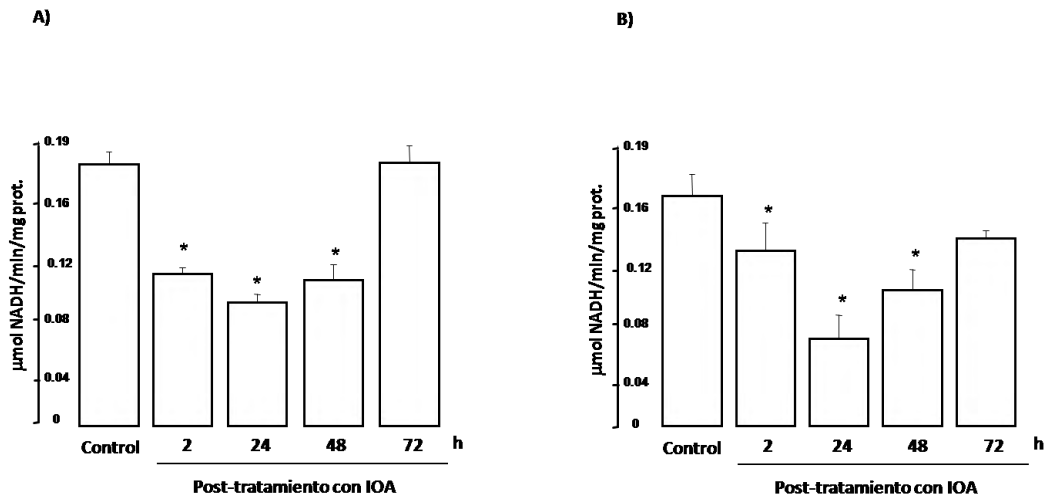


Figura 12. Actividad de la GAPDH en los ratones silvestres y su inhibición por del tratamiento con IOA (15 mg/kg por 3 días) en el estriado (A) y la corteza cerebral (B). La actividad se monitoreó 2, 24, 48 y 72 horas después de la última inyección. En todos los tejidos el IOA inhibe significativamente la actividad (* $P \leq 0.05$) relativo al grupo control. Los resultados se expresan como el promedio de la formación de NADH por minuto por miligramo de proteína \pm error estándar de 4-8 animales por grupo.

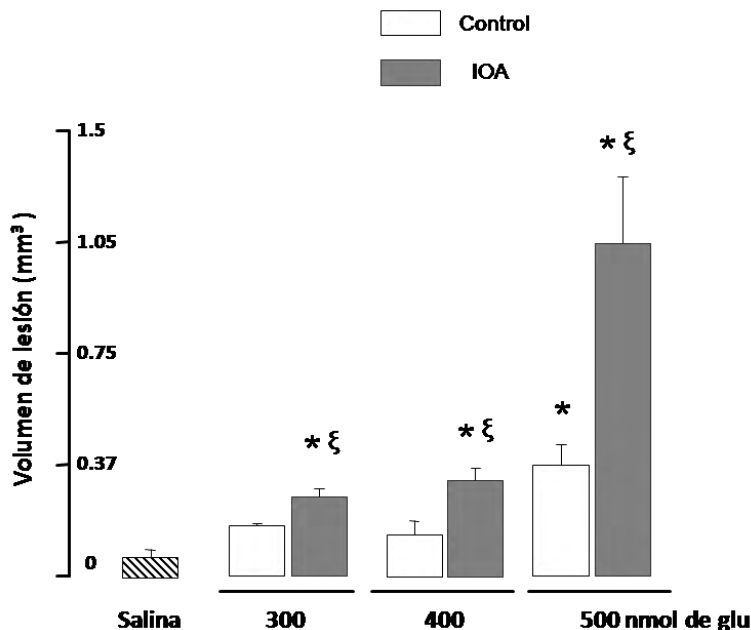


Figura 13. Curva dosis respuesta del volumen de lesión inducido por la administración de 300, 400 ó 500 nmol de glutamato en el estriado de ratones silvestres control o tratados con el inhibidor de la GAPDH. El volumen de lesión se cuantificó 24 horas después de la cirugía. Datos obtenidos de grupos de 3-4 animales, expresados como promedio \pm error estándar. * $P \leq 0.05$ relativo al grupo inyectado con salina, § $P \leq 0.05$ respecto a los animales

inyectados con glutamato pertenecientes al grupo control.

“Muerte neuronal excitotóxica en el estriado del ratón transgénico R6/2 durante la inhibición de la GAPDH y su relación con cambios en los transportadores de glutamato”

Los resultados que a continuación se describen forman parte del manuscrito titulado *“Glycolysis inhibition decreases the levels of glutamate transporters and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington’s disease mice”* por Estrada-Sánchez Ana María, Montiel Teresa y Massieu Lourdes, *Neurochemical Research* en prensa.

De acuerdo con los resultados mencionados en la sección anterior, la lesión producida por el glutamato a las 10 semanas de edad es similar entre los ratones silvestres y transgénicos. Estos resultados concuerdan con trabajos previos que describen que el modelo R6/2 no es más vulnerable a la excitotoxicidad inducida por agonistas del receptor NMDA o kainato a esta edad (MacGibbon et al., 2002; Morton y Leavens, 2000). Estudios previos del laboratorio sugieren que la inhibición glucolítica facilita la muerte neuronal producida por glutamato, y que ese efecto se asocia con la disminución del contenido del transportador GLT-1 y con la subsecuente reducción en la captura de glutamato (Camacho et al., 2007). Dado que los resultados expuestos en la sección anterior sugieren que en el ratón R6/2, las alteraciones en los transportadores de glutamato son necesarias para que ocurra daño excitotóxico, en la segunda parte de la tesis se determinó si la inhibición glucolítica, que sabemos reduce la recaptura del glutamato, facilita la toxicidad de este aminoácido en el estriado de los ratones R6/2 a las 10 semanas de edad, cuando todavía no presentan una reducción de los niveles de GLT-1 y GLAST.

Actividad de la GAPDH y su inhibición por el tratamiento con IOA

Como se describió previamente en esta tesis, la dosis de 15 mg/kg de IOA administrada intraperitonealmente durante tres días, inhibe significativa y sostenidamente la actividad de la GAPDH en el cerebro de ratones albinos y silvestres. Por lo tanto, se utilizó este protocolo de administración en los ratones R6/2.

La actividad basal de la GAPDH en el estriado, el hipocampo y la corteza cerebral de los ratones transgénicos es similar a la actividad observada en los animales silvestres (Figura 14). La actividad de la GAPDH se determinó dos horas después de la última inyección del IOA (15mg/kg/3días). De acuerdo con los resultados, el tratamiento con IOA disminuye la actividad de la enzima en todas las regiones cerebrales estudiadas, tanto en animales silvestres como transgénicos, siendo más acentuada la inhibición en los ratones R6/2. En los animales transgénicos, la inhibición de la GAPDH en el estriado es de 59.2%, mientras que en los animales silvestres es de 41.9% (Figura 14A); en la corteza cerebral la actividad de la GAPDH disminuyó en un 67.8% en los ratones R6/2 mientras que en los silvestres se redujo en un 23.8% (Figura 14B). En el hipocampo, la actividad se inhibió en un 63.5% en los ratones transgénicos y en un 33% en los animales silvestres (Figura 14C).

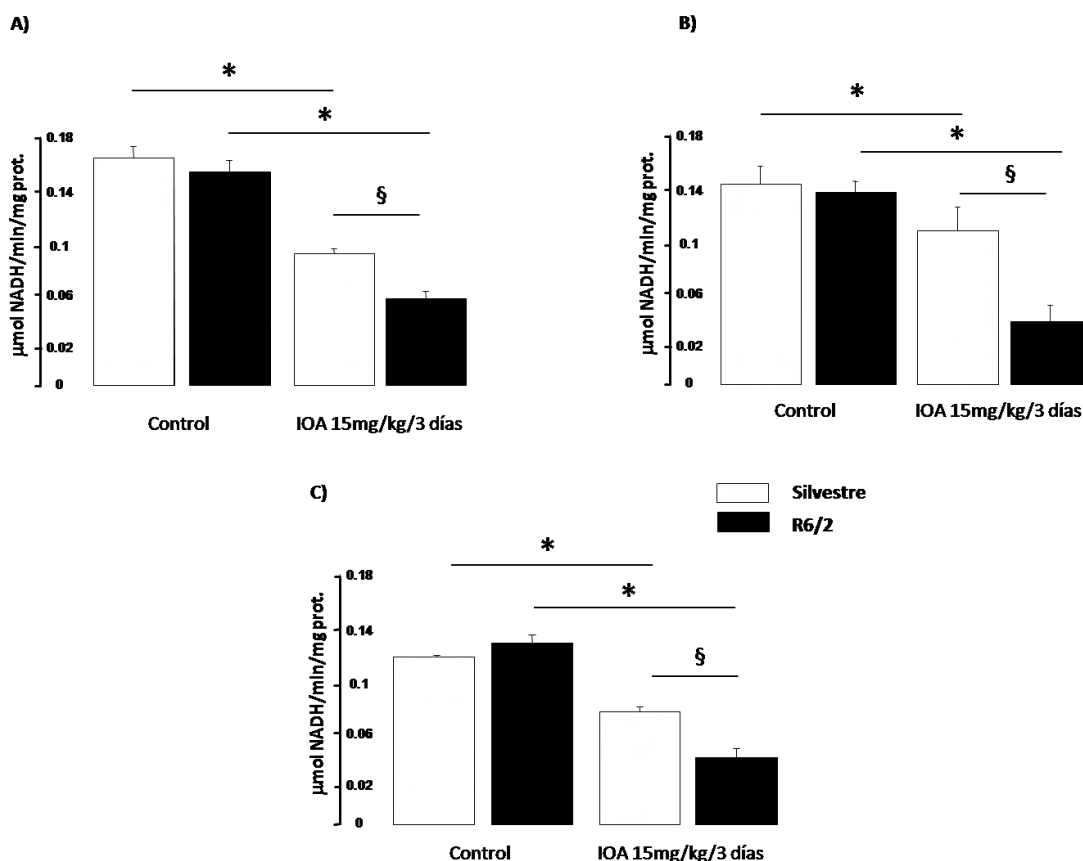


Figura 14. Actividad de la GAPDH en el estriado A), la corteza B) y el hipocampo C) de ratones silvestres y R6/2 tratados con el IOA (15mg/kg/3 días). La actividad se determinó dos horas después de la última inyección. En todos los tejidos el IOA inhibe significativamente la actividad (* $P \leq 0.05$) relativo al grupo control. La inhibición de la actividad es más pronunciada y estadísticamente diferente en los animales transgénicos (§ $P \leq 0.05$) relativo a la disminución de la actividad observada de los animales silvestres tratados con IOA. Los resultados se expresan como el promedio de la formación de NADH por minuto por miligramo de proteína \pm error estándar de 4-5 animales por grupo.

Papel de los transportadores GLT-1 y GLAST en la toxicidad del glutamato durante la inhibición de la GAPDH

Los niveles de proteína de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST así como los cambios inducidos por la inhibición de la GAPDH se determinaron por inmunoensayo en el estriado y la corteza cerebral. De acuerdo con los resultados, en el estriado (Figura 15), los niveles de GLT-1 disminuyen 14.5% en ratones silvestres y 33.6 % en los ratones R6/2, siendo significativo únicamente en los ratones transgénicos (Figura 15A). En el caso de GLAST también observamos que el IOA reduce el contenido de proteína en la misma proporción en los animales silvestres y transgénicos (~40%; Figura 15B). Asimismo, en la corteza cerebral (Figura 16) el tratamiento con

IOA reduce los niveles de GLT-1 (Figura 16A) y GLAST (Figura 16B), en un 40% respecto a los valores control.

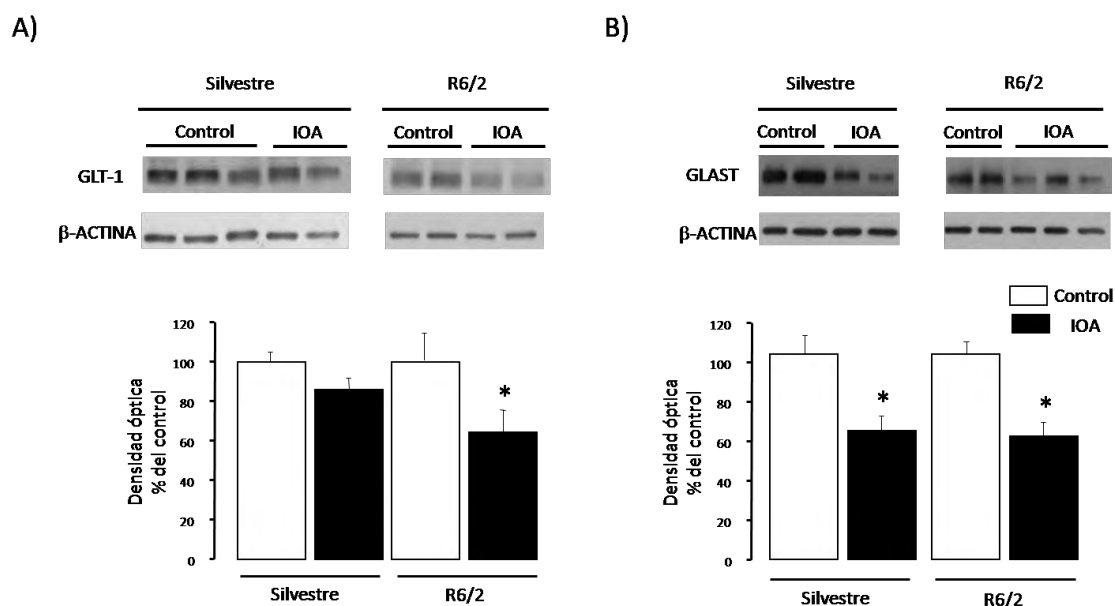


Figura 15. Cambios en los niveles de proteína de GLT-1 (A) y GLAST (B) en el estriado de ratones silvestres y R6/2 tratados con IOA. Los cambios en el contenido de proteína se reportan como el porcentaje de cambio en la densidad óptica respecto al control. Se usó como control de carga a la β -actina. * $P \leq 0.05$ relativo al grupo control correspondiente. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de 5-6 animales por condición.

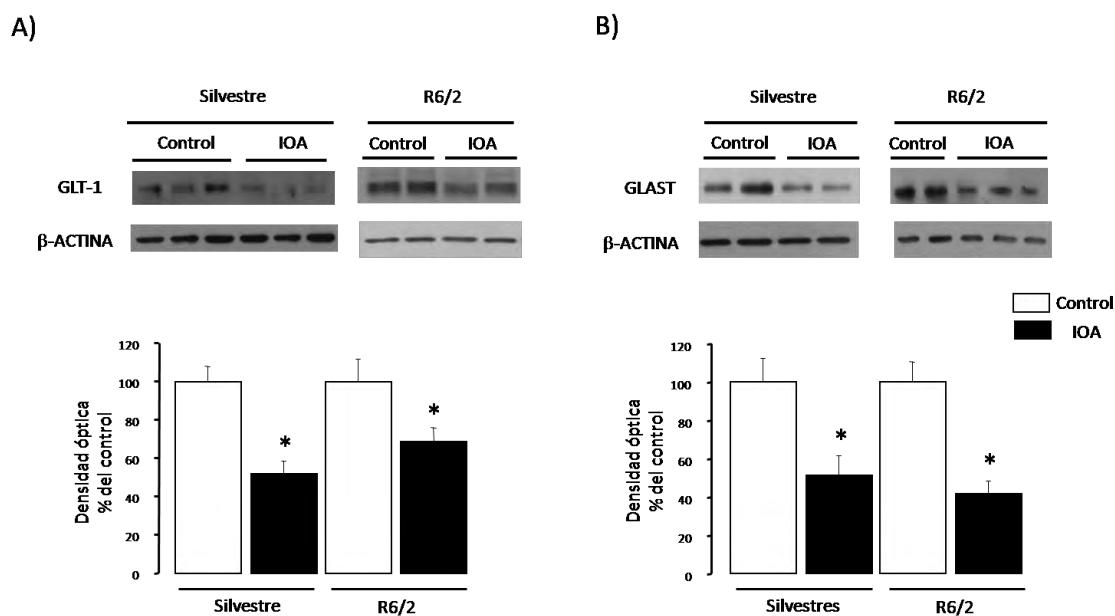


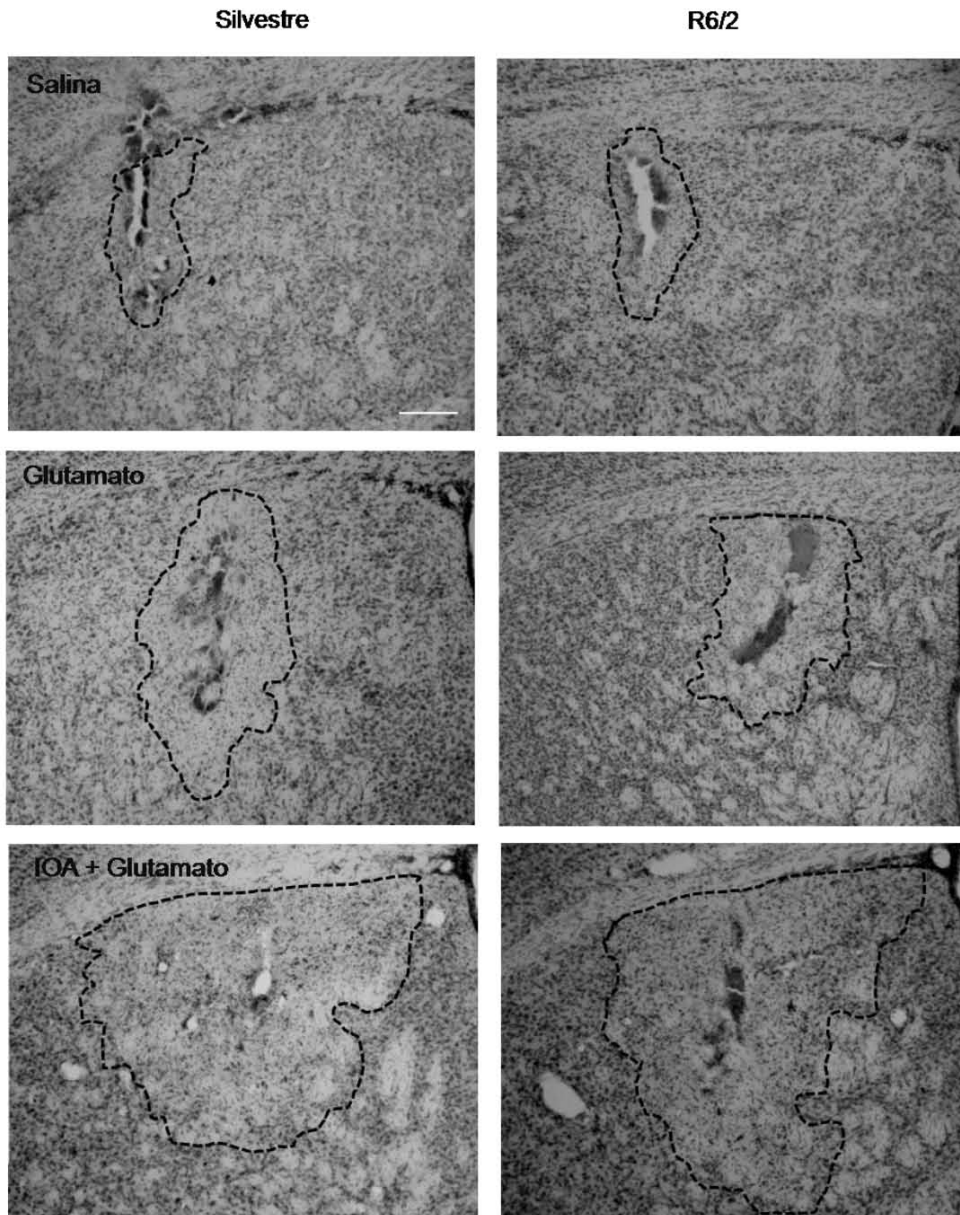
Figura 16. Cambios en los niveles de proteína de GLT-1 (A) y GLAST (B) en la corteza cerebral de ratones silvestres y R6/2 control o tratados con IOA. Los cambios en el contenido de proteína se reportan como el porcentaje de cambio en la densidad óptica respecto al control. * $P \leq 0.05$ relativo al grupo control correspondiente. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de 4-6 animales por condición.

Vulnerabilidad del estriado a la toxicidad del glutamato durante la inhibición de la GAPDH

La lesión producida por la inyección intraestriatal de 500 nmol de glutamato en los animales tratados con el IOA y en los animales sin tratamiento se determinó 24 horas después de la cirugía. Como se describió en la sección anterior, el glutamato produce un volumen de lesión mayor respecto al grupo inyectado con salina. Sin embargo, la vulnerabilidad a la toxicidad del glutamato de los ratones R6/2 es similar a la de los ratones silvestres. Aunque los animales transgénicos presentan un volumen de lesión ligeramente mayor al que muestran los animales silvestres, éste no es estadísticamente diferente (volumen de lesión R6/2 = 0.229 ± 0.28 ; silvestres = 0.161 ± 0.033 mm³; Figura 17A). La inhibición de la vía glucolítica facilita significativamente la toxicidad del glutamato tanto en los ratones transgénicos como en los silvestres. Mientras que en los ratones silvestres tratados con IOA, la lesión producida por el glutamato es 3.9 veces mayor respecto al grupo control, en los ratones transgénicos la inhibición de la GAPDH induce una lesión 2.2 veces más extensa (Figura 17B). El efecto facilitador del daño excitotóxico por el IOA, no es diferente estadísticamente entre los ratones silvestres y transgénicos.

El número de células positivas a Fluoro jade en los animales inyectados con glutamato es mayor al del grupo inyectado con salina. Aún cuando en el estriado de los ratones transgénicos, la inyección de glutamato da lugar a un número mayor de células positivas a Fluoro jade respecto a los animales silvestres, la diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 18). Por otra parte, el número de células dañadas por la administración de glutamato en condiciones de inhibición glucolítica es semejante entre los animales transgénicos y silvestres, y es menor en los animales tratados con IOA que en los no tratados, en ambos grupos (Figura 18). Este resultado es inesperado puesto que el volumen de lesión aumenta en los animales tratados con IOA tanto silvestres como transgénicos. Este resultado posiblemente pueda explicarse debido a una precipitación de la muerte neuronal en los animales tratados con IOA, de tal manera que a las 24 h solamente es posible detectar un número reducido de neuronas positivas a Fluoro jade, ya que un número considerable de células podría haberse eliminado. En su conjunto, los resultados demuestran que el tratamiento con IOA exacerba la muerte neuronal producida por glutamato y que los animales transgénicos y silvestres responden de manera similar.

A)



B)

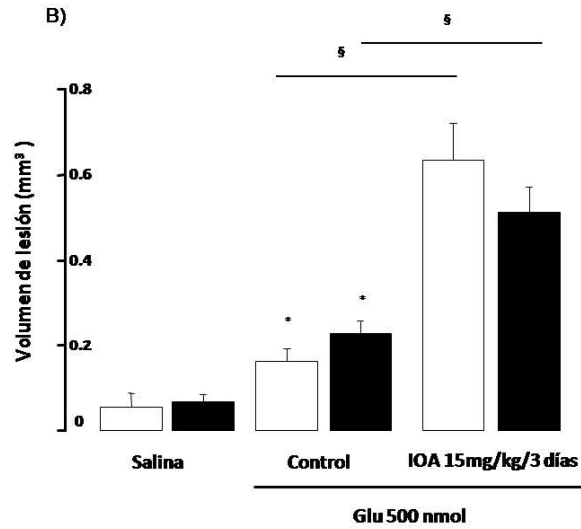


Figura 17. Facilitación de la muerte neuronal mediada por glutamato durante la inhibición de la glucólisis. Se muestran tejidos representativos mostrando el daño producido en animales silvestres y transgénicos después de la inyección de salina ó de 500 nmol de glutamato (A). En condiciones de inhibición glucolítica la lesión producida por el glutamato es más extensa. Volumen de lesión en ratones silvestres y transgénicos evaluada 24 horas después de la cirugía; se observa un aumento del volumen de lesión producido por la administración de glutamato cuando la GAPDH está inhibida (B). * $P \leq 0.05$ relativo a la lesión producida por la inyección de salina. § $P \leq 0.05$ relativo al daño producido por el glutamato en el grupo control no tratado con IOA. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de 3-5 animales, barra de escala= 200 μm .

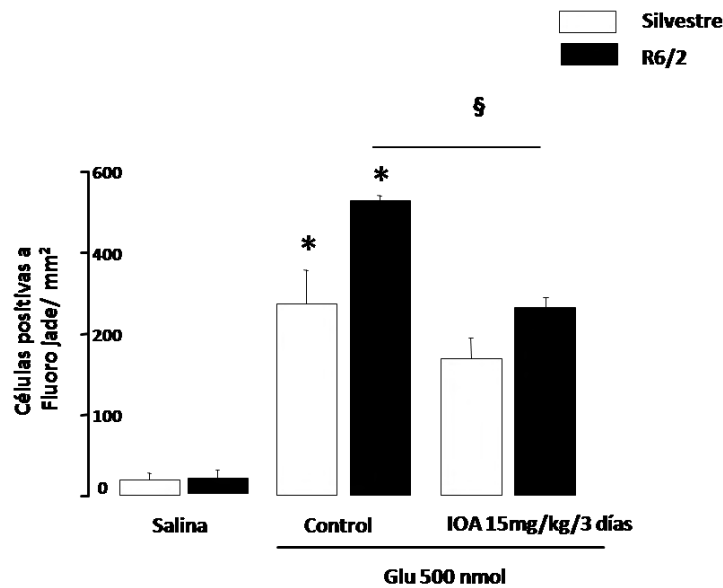


Figura 18. Número de células dañadas en el estriado de ratones silvestres y R6/2. Dos horas después del tratamiento con IOA o vehículo, se inyectaron 500 nmol de glutamato en el estriado de ratones silvestres y R6/2. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de 3-5 animales. * $P \leq 0.05$ relativo a la lesión producida por la inyección de salina. § $P \leq 0.05$ relativo al daño producido por el glutamato en el grupo control no tratado con IOA

➤ **DISCUSIÓN SEGUNDA PARTE**

Dado que a las 10 semanas de edad los ratones R6/2 y silvestres son igualmente vulnerables a la toxicidad del glutamato, decidimos evaluar si el tratamiento con IOA favorece la toxicidad del neurotransmisor en el estriado del ratón R6/2 a esta edad. Este experimento se sugirió en base a observaciones previas que indican que el tratamiento con IOA facilita la muerte neuronal mediada por glutamato (Massieu et al., 2000; Mejía-Toiber et al., 2006; Camacho et al., 2007), y que a su vez induce una disminución en los niveles de sus transportadores (Camacho et al., 2007).

Inicialmente se evaluó el grado de inhibición de la GAPDH inducida por el tratamiento con IOA. Los resultados demuestran que la actividad basal de la GAPDH es similar entre los animales silvestres y transgénicos. En ambos grupos, el tratamiento con IOA, inhibe la actividad de la GAPDH, sin embargo, la inhibición es más acentuada en el ratón R6/2. Dado que el tratamiento con IOA dura 3 días y a que el IOA se une de manera irreversible a la GAPDH, es posible que la mayor inhibición obtenida en el grupo transgénico sea consecuencia de alteraciones en la síntesis y degradación de la enzima. En estudios *in vitro* se ha observado que el sistema de degradación del proteasoma está inhibido o disminuido cuando se encuentra la mhtt (Waelter et al., 2001; Jana et al., 2001), y por otra parte se ha sugerido que el recambio de proteínas podría estar alterado en modelos transgénicos y en células que expresan la mhtt (Cha et al., 2000, Zabel et al., 2009). En conjunto estas alteraciones generarían una acumulación de proteínas alteradas, posiblemente la GAPDH con el IOA unido, mientras que la falla en la síntesis de proteínas *de novo* impediría el recambio de la enzima. En este sentido sería importante evaluar el tiempo de recuperación de la actividad de la GAPDH en el ratón R6/2.

Previamente determinamos en los ratones silvestres la actividad de la GAPDH a diferentes tiempos después del tratamiento con IOA. De acuerdo con estos experimentos sabemos que a las 72 horas después del tratamiento con IOA, la actividad de la GAPDH se recupera y es semejante al grupo control. Si una inhibición mayor de la GAPDH en los ratones R6/2 está asociada con los mecanismos mencionados es de esperar una recuperación a tiempos posteriores de las 72 horas. Estos experimentos ya no se pudieron realizar debido a que se contaba con pocos animales en la colonia.

El papel de la falla glucolítica en la EH se ha sugerido a partir de estudios en cerebros de pacientes presintomáticos en los que se ha descrito una reducción en esta

vía metabólica (Powers et al., 2007), así como la acumulación de lactato en líquido cefalorraquídeo (Jenkins et al., 1998). Aún cuando se desconocen los mecanismos que promueven la falla en la glucólisis en la EH, posiblemente la GAPDH tenga un papel importante, ya que en trabajos *in vitro* se describió que la mhtt es capaz de unirse a la GAPDH (Burke et al., 1996; Bae et al., 2006). Posiblemente la unión de la mhtt impide que la GAPDH lleve a cabo su función en la vía glucolítica. Se ha descrito que la actividad de la GAPDH disminuye en tejido *post mortem* de pacientes (Kish et al., 1998; Mazzola y Sirover, 2001). En los ratones R6/2, se ha sugerido que la actividad de la GAPDH puede estar disminuída, ya que se ha observado que la GAPDH se encuentra en agregados proteicos que se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo (Senatorov et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que no hay diferencia en la actividad de la GAPDH en ratones silvestres respecto a los animales transgénicos. Por otra parte, se ha observado que durante un estrés metabólico, la actividad de la GAPDH es menor en fibroblastos de pacientes con la EH (Cooper et al., 1998), lo que sugiere que en células que expresan a la mhtt, la GAPDH es capaz de mantener su actividad en condiciones basales, pero que durante condiciones de estrés, como la ausencia de suero, en las que es necesario un aumento de su actividad, ésta no es capaz de responder de manera eficiente.

Por otra parte, además de su papel en la vía glucolítica la GAPDH está involucrada en otros procesos celulares como la transcripción de proteínas, transporte celular, y procesos de señalización asociados con muerte apoptótica (Chuang et al., 2005; Mazzola y Sirover, 2002). Es posible que durante la progresión de la EH, diversos procesos celulares en los que interviene la GAPDH estén alterados por su interacción con la mhtt. Sin embargo, aún se desconocen dichas alteraciones así como su papel en la etiología de la enfermedad.

La administración de glutamato en el estriado de animales tratados con IOA genera un volumen de lesión mayor respecto a la obtenida en animales control, lo cual es consistente con lo que hemos reportado en el hipocampo y el estriado de la rata (Massieu et al., 2000; Mejía-Toiber et al., 2006; Camacho et al., 2007). Los presentes resultados demuestran que los animales transgénicos son más vulnerables a la toxicidad de glutamato cuando la vía glucolítica está inhibida. De acuerdo con el análisis de la proteína de los transportadores de glutamato, observamos que el tratamiento con IOA promueve la disminución de los niveles de transportadores GLT-1 y GLAST en ratones silvestres y transgénicos; además, el grado de reducción del

contenido de proteína es el mismo (25% de los niveles de GLT-1 y 40 % en GLAST) en ambos grupos de ratones. Este resultado está asociado con que la inhibición de la glucólisis facilita la toxicidad del glutamato en la misma magnitud en ambos grupos. Estas observaciones corroboran los resultados de la primera parte, en la que describimos una correlación entre la falla en el sistema de recaptura y la toxicidad del glutamato en la EH. El hecho de que la vulnerabilidad del estriado en condiciones de inhibición de la GAPDH sea la misma en los ratones silvestres y transgénicos, indica que a las 10 semanas de edad los ratones transgénicos a pesar de que presentan alteraciones en el metabolismo celular (Tabrizi et al., 1999; Browne y Beal., 2004), en los receptores de glutamato (Cha et al., 1998; André et al., 2006), y un aumento en la producción en especies reactivas de oxígeno (Bogdanov et al., 2001; Pérez-Severiano et al., 2002; Browne y Beal, 2006), se comportan igual que los silvestres en cuanto al desarrollo de una lesión excitotóxica inducida en condiciones de estrés metabólico. En este sentido se ha sugerido que durante la progresión de la enfermedad, los ratones R6/2 desarrollan mecanismos compensatorios (aumento en la defensa antioxidante, mayor expresión de proteínas que unen calcio evitando así la sobrecarga de éste) entre otras; permitiendo contender con las alteraciones generadas por la presencia de la mhtt (Zuchner y Brundin, 2008). Esto explicaría por qué durante la EH de tipo adulto la muerte neuronal ocurre hasta los 40-45 años de edad, sugiriendo que hay un punto en el que las neuronas ya no son capaces de lidiar con las alteraciones producidas por la mhtt.

Por otra parte, además del papel de los transportadores de glutamato en la toxicidad de este aminoácido durante la inhibición de la GAPDH, los subtipos de receptores de glutamato pueden estar participando de manera diferencial en la cascada excitotóxica. Debido a que el ácido glutámico actúa sobre los receptores NMDA, AMPA, kainato y metabotrópicos, es posible que la toxicidad del glutamato en condiciones de inhibición glucolítica esté mediada por los receptores AMPA, ya que en estudios previos se demostró que a las 10 semanas de edad los ratones R6/2 son resistentes a la toxicidad mediada por los receptores NMDA y kainato (MacGibbon et al., 2002; Morton y Leavens, 2000). En este sentido, previamente se observó que el modelo R6/1 es más vulnerable a la toxicidad mediada por AMPA (Hansson et al., 2001), y alteraciones en estos receptores se han descrito en tejidos *post mortem* (Akbarian et al., 1995). Sin embargo, el papel de los receptores AMPA en la vulnerabilidad de las NEM en la EH, es un tema poco explorado. Otra alternativa es

que el tratamiento con IOA promueva cambios en los receptores de glutamato que permitan el desarrollo de un evento excitotóxico. En este sentido, previamente observamos que el tratamiento con IOA aumenta el contenido total así como la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA en el hipocampo de la rata (Camacho et al., 2007). Bajo estas circunstancias el receptor permanece más tiempo abierto facilitando la entrada de calcio en la neurona, iniciando una cascada excitotóxica (Camacho et al., 2007).

Es interesante que los niveles de transportadores puedan modificarse por alteraciones en la vía glucolítica. A partir de estos resultados es posible sugerir que una inhibición crónica en la vía glucolítica a lo largo de la vida de los pacientes, la cual se ha reportado en pacientes presintomáticos (Powers et al., 2007), pueda estar asociada con la reducción de los niveles de GLT-1 y con la disminución en la captura de glutamato que se ha descrito en tejido *post mortem* (Arzberger et al., 1997; Hassel et al., 2008). En conjunto, estos resultados sugieren una estrecha relación entre las alteraciones en la función de los transportadores de glutamato y la vía glucolítica, que pueden culminar en un evento excitotóxico.

➤ **CONCLUSIÓN GENERAL**

La EH se caracteriza por la manifestación progresiva de alteraciones motoras así como por la muerte de las NEM en etapas tardías de la enfermedad. Esto sugiere que inicialmente, la expresión de la mhtt altera la transmisión sináptica y que a lo largo de la vida del paciente, la acumulación de alteraciones así como la falla de los sistemas de defensa, permiten que estímulos tóxicos, como la exposición al glutamato, tengan lugar. Aunado a las alteraciones neuronales producidas por la mhtt, los astrocitos que también expresan esta proteína, desarrollan progresivamente alteraciones en mecanismos esenciales para la función neuronal, contribuyendo así a la susceptibilidad de las neuronas. En esta tesis demostramos que en etapas avanzadas de la enfermedad en el ratón de la línea R6/2 hay una disminución en el contenido de los principales transportadores de glutamato GLAST y GLT-1, lo que daría lugar a la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, generando una lesión de tipo excitotóxica. Estos resultados se apoyan en el hecho de que la inducción de una disminución en los niveles de los transportadores de glutamato a las 10 semanas de edad, por efecto del tratamiento con IOA, facilita la toxicidad del glutamato en el modelo R6/2. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la muerte neuronal excitotóxica está asociada con la pérdida de las NEM en la EH. Asimismo, que las alteraciones en los astrocitos (disminución en el contenido de transportadores de glutamato), pueden contribuir de manera relevante a la progresión de la EH.

➤ **BIBLIOGRAFÍA**

- Akbarian S, Smith MA, Jones EG. Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res* 1995;699:297-304.
- Albensi BC. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr Pharm Des* 2007;13:3185-3194.
- Albin RL, Young AB, Penny JB, Handelin B, Balfour R, Anderson KD, et al. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N Engl J Med* 1990;322:1293-1298.
- Ali NJ, Levine MS. Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits occur early in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Dev Neurosci* 2006;28:230-238.
- Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates PG, Lin SC, Srinidhi J, et al. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 1994;20:27-38.
- André VM, Cepeda C, Venegas A, Gomez Y, Levine MS. Altered cortical glutamate receptor function in the R6/2 model of Huntington's disease. *J Neurophysiol* 2006;95:2108-2119.
- Arning L, Kraus PH, Valentin S, Saft C, Andrich J, Epplen JT. NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease. *Neurogenetics* 2005;6:25-28.
- Arning L, Saft C, Wiczorek S, Andrich J, Kraus PH, Epplen JT. NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease in a sex-specific manner. *Hum Genet* 2007;122:175-182.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 1994;14:5559-5569.
- Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease-an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:440-454.

- Bae BI, Hara MR, Cascio MB, Wellington CL, Hayden MR, Ross CA, Ha HC, Li XJ, Snyder SH, Sawa A. Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:3405-3409.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Millar JM, et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993;13:4181-4192.
- Behrens PF, Franz P, Woodman B, Lindenberg KS, Landwehrmeyer GB. Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* 2002;125:1908-1922.
- Beister A, Kraus P, Kuhn W, Dose M, Weindl A, Gerlach M. The N-methyl-D-aspartate antagonist memantine retards progression of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl* 2004;68:117-122.
- Benn CL, Sun T, Sadri-Vakili G, McFarland KN, DiRocco DP, Yohrling GJ, Clark TW, Bouzou B, Cha JH. Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters *in vivo*, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *J Neurosci* 2008;28:10720-10733.
- Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 2001;79:1246-1249.
- Bogdanov MB, Ferrante RJ, Kuemmerle S, Klivenyi P, Beal MF. Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J Neurochem* 1998;71:2642-2644.
- Boudker O, Ryan RM, Yernool D, Shimamoto K, Gouaux E. Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* 2007;445:387-393.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Browne SE, Beal MF. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:2061-2073.
- Browne SE, Beal MF. The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* 2004;29:531-546.

- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 1997;41:646-653.
- Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, Vance JM, Strittmatter WJ. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 1996;2:347-350.
- Camacho A, Montiel T, Massieu L. Sustained metabolic inhibition induces an increase in the content and phosphorylation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors and a decrease in glutamate transport in the rat hippocampus *in vivo*. *Neuroscience* 2007;145:873-886.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 1999;19:3248-3257.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:919-930.
- Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernandez J, Chandler SH, Leavitt BR, et al. NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res* 2001;66:525-539.
- Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6480-6485.
- Cha JH. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci* 2000;23:387-392.
- Chai Y, Koppenhafer SL, Shoemith SJ, Perez MK, Paulson HL. Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation *in vitro*. *Hum Mol Genet* 1999;8:673-682.
- Chen N, Luo T, Wellington C, Metzler M, McCutcheon K, Hayden MR, et al. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* 1999;72:1890-1898.
- Chen Y, Swanson R. The glutamate transporter EAAT2 and EAAT3 mediates cysteine uptake in cortical neurons cultures. *J Neurochem* 2003;84:1332-1339.

- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger U, Bassan M, Desilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg P. The glutamate transporter GLT-1a is expressed in excitatory axon terminal of hippocampal neurons. *J Neurosci* 2004;24:1136-1148.
- Cholet N, Pellerin L, Welker E, Lacombe P, Seylaz J, Magistretti P, Bonvento G. Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:404-412.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome C release. *Hum Mol Genet* 2004;13:1407-1420.
- Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:269-290.
- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 1992;258:1498-1501.
- Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:205-237.
- Cooper AJ, Sheu KF, Burke JR, Strittmatter WJ, Blass JP. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase abnormality in metabolically stressed Huntington disease fibroblasts. *Dev Neurosci* 1998;20:462-468.
- Cross AJ, Slater P, Reynolds GP. Reduced high-affinity glutamate uptake sites in the brains of patients with Huntington's disease. *Neurosci Lett* 1986;67:198-202.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 2006;127:59-69.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:327-335.
- Ferrante RJ. Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:506-520.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1-105.

- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. Increased current NMDA current and spine density in my lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998;393:377-381.
- Debernardi R, Magistretti PJ, Pellerin L. Trans-inhibition of glutamate transport prevents excitatory amino acid-induced glycolysis in astrocytes. *Brain Res* 1999 ;850:39-46.
- Del Río P, Montiel T, Massieu L. Exacerbation of excitotoxic neuronal death induced during mitochondrial inhibition *in vivo*: relation to energy imbalance. *Neuroscience* 2007;146:1561-1570.
- Gianfriddo M, Melani A, Turchi D, Giovannini MG, Pedata F. Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiol Dis* 2004;17:77-88.
- Goebel HH, Heipertz R, Scholz W, Iqbal K, Tellez-Nagel I. Juvenile Huntington chorea: clinical, ultrastructural, and biochemical studies.1978;28:23-31.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 1985;227:770-773.
- Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* 1998;84:503-510.
- Graham RK, Pouladi MA, Joshi P, Lu G, Deng Y, Wu NP, Figueroa BE, Metzler M, André VM, Slow EJ, Raymond L, Friedlander R, Levine MS, Leavitt BR, Hayden MR. Differential susceptibility to excitotoxic stress in YAC128 mouse models of Huntington disease between initiation and progression of disease. *J Neurosci* 2009;29:2193-2204.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, André VM, Wilburn B, Lu XH, Tao J, Yamazaki I, Li SH, Sun YE, Li XJ, Levine MS, Yang XW. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* 2008;28:6182-6195.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983;306:234-238.

- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 1996;39:385-389.
- Hansson O, Guatteo E, Mercuri NB, Bernardi G, Li XJ, Castilho RF, Brundin P. Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioural deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the huntington gene. *Eur J Neurosci* 2001;14:1492-1504.
- Hansson O, Petersen A, Leist M, Nicotera P, Castilho RF, Brundin P. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8727-8732.
- Harper SP. Huntington's disease. W.B. Saunders company Ltd; 1991. pp. 127-141.
- Hassel B, Dingledine R. Glutamate. En: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 2006, Maywood Illinois, pp. 267-290
- Hassel B, Tessler S, Faull RL, Emson PC. Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochem Res* 2008;33:232-237.
- Hickey MA, Morton AJ. Mice transgenic for the Huntington's disease mutation are resistant to chronic 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity. *J Neurochem* 2000;75:2163-21671.
- Hodgson JG, Apopyan N, Gutekunts CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 1999;23:181-192.
- Huettner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 2003;70:387-407.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang Gh, Nukina N. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 2001;10:1049-1059.
- Jenkins BG, Rosas HD, Chen YC, Makabe T, Myers R, MacDonald M, Rosen BR, Beal MF, Koroshetz WJ. 1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 1998;50:1357-1365.

- Kanai Y, Trotti D, Berger UV, Hediger MA. The high-affinity glutamate and neutral amino-acid transporter family. En: Reith MEA. Neurotransmitter transporters: structure, function and regulation, 2nd edition. 2002, pp. 255-297.
- Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004;18:357-368.
- Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate structure and pharmacology. *Psychopharmacol* 2005;179:4-29.
- Kim CH, Lee J, Lee J-Y, Roche KW. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J Neurosci Res* 2008;86:1-10.
- Kish SJ, Lopes-Cendes I, Guttman M, Furukawa Y, Pandolfo M, Rouleau GA, Ross BM, Nance M, Schut L, Ang L, DiStefano L. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. *Arch Neurol* 1998;55:1299-1304.
- Kuhl DE, Phelps ME, Markham CH, Metter EJ, Riege WH, Winter J. Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann Neurol* 1982;12:425-434.
- Kuwert T, Lange HW, Langen KJ, Herzog H, Aulich A, Feinendegen LE. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 1990;113:1405-1423.
- Lerma J. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:481-95.
- Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR, et al. Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:1113-1121.
- Liévens JC, Rival T, Iché M, Chneiweiss H, Birman S. Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2005;14:713-724.
- Liévens JC, Woodman B, Mahal A, Spasic-Bosovic, Samuel D, Kerkerian-Le Goff, et al. Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2001;8:807-821.

- Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Dell'Agnello G, Petrozzi L, Rossi G, et al. Amantadine in Huntington's disease: open-label video-blinded study. *Neurol Sci* 2002;23:S83-S84.
- Luthi-Carter R, Apostol BL, Dunah AW, DeJohn MM, Farrell LA, Bates GP, et al. Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington's disease mouse brain: analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation. *Neurobiol Dis* 2003;14:624-636.
- MacDonald ME, Vonsattel JP, Shrinidhi J, Couropmitree NN, Cupples LA, Bird ED, Gusella JF, Myers RH. Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 1999;53:1330-1332.
- MacGibbon GA, Hamilton LC, Crocker SF, Costain WJ, Murphy KM, Robertson HA, Denovan-Wright EM. Immediate-early gene response to methamphetamine, haloperidol, and quinolinic acid is not impaired in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci Res* 2002;67:372-378.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996;87:493-506.
- Massieu L, Gómez-Roman N, Montiel T. *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 2000;165:257-267.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 2003;120:365-378.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yusaki M. Cloning and characterization of novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Mol Brain Res* 2002;100:43-52.
- Mazzola JL, Sirover MA. Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? *Neurotoxicology* 2002;23:603-609.
- Mazzola JL, Sirover MA. Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts. *J Neurochem* 2001;76:442-449.

- McGeer EG, McGeer PL. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 1976;263:517-519.
- McGill JK, Beal MF. PGC-1 α , a new therapeutic target in Huntington's disease?. *Cell* 2006;127:465-468.
- Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L. D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition. *Neurochem Res* 2006;31:1399-1408.
- Menalled LB. *Knock-in* mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* 2005;2:465-470.
- Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 1998;54:369-415.
- Miller BR, Dorner JL, Shou M, Sari Y, Barton SJ, Sengelaub DR, Kennedy RT, Rebec GV. Up-regulation of GLT-1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse. *Neuroscience* 2008;153:329-337.
- Morton AJ, Leavens W. Mice transgenic for the human Huntington's disease mutation have reduced sensitivity to kainic acid toxicity. *Brain Res Bull* 2000;52:51-59.
- Nance MA y Miers RH. Juvenile onset Huntington's disease, clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Rese Rev* 2001;7:153-157.
- Nicnocaill B, Haraldsson B, Hansson O, O'Connor WT, Brundin P. Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2001;13:206-210.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 1988;451:205-212.
- Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001 293;291:2423-2428.
- Palfi S, Ferrante RJ, Brouillet E, Beal MF, Dolan R, Guyot NC, et al. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996;16:3019-3025.

- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 2002;5:731-736.
- Paschen W, Hedreen JC, Ross CA. RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in human brain tissue. *J Neurochem* 1994;63:1596-1602.
- Paxinos G, Franklin K. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, USA.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Ríos C, Segovia J. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res* 2002;95:36-42.
- Pérez-Severiano F, Ríos C, Segovia J. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res* 2000;862:234-237.
- Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Cini C, De Marco C, Butterfield DA. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1849-1861.
- Powers WJ, Videen TO, Markham J, McGee-Minnich L, Antenor-Dorsey JV, Hershey T, Perlmutter JS. Selective defect of *in vivo* glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2945-2949.
- Rasmussen A. Huntington infantil y juvenil. En: Mateos Gómez H. Enfermedad de Huntington "Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez". México D.F. 2000. pp. 22-27.
- Ravenscroft P, Brotchie J. NMDA receptors in the basal ganglia. *J Anat* 2000;196:577-585.
- Rodríguez-Moreno A, Lerma J. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*. 1998;20:1211-1218.
- Romano C, Chen Q, Olney JW. The interact isolated (ex vivo) retina as model system for the study of excitotoxicity. *Prog Ret Eye Res* 1998;17:465-483.

- Rothstein JD, Dykes-Hober M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kannai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knock out of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996;16:675-686.
- Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, Dodge A, Norbury G, Rosser E, et al. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3872-3876.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical cultures. *J Neurophysiol* 2002;87:2052-2063.
- Schiefer J, Sprünken A, Puls C, Lüese HG, Milkereit A, Milkereit E, et al. The metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP and mGluR2 agonist LY379268 modify disease progression in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Brain Research* 2004;1019:246-254.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 1999;8:397-407
- Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 2000;874:123-130.
- Schwarcz R, Coyle JT. Neurochemical sequelae of kainate injections in corpus striatum and substantia nigra of the rat. *Life Sci* 1977;20:431-436.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Kohler C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 1984;35:19-32.
- Segovia J. Transgenic model for the study of oxidative damage in Huntington's disease. *Methods Enzymol* 2002;353:365-373.
- Senatorov VV, Charles V, Reddy PH, Tagle DA, Chuang DM. Overexpression and nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:285-297.

- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 2005;171:1001-1012.
- Snider BJ, Moss JL, Revilla FJ, Lee CS, Wheeler VC, MacDonald ME, et al. Neocortical neurons cultured from mice with expanded CAG repeats in the huntingtin gene: unaltered vulnerability to excitotoxins and other insults. *Neuroscience* 2003;120:617-625.
- Spampanato J, Gu X, Yang XW, Mody I. Progressive synaptic pathology of motor cortical neurons in a BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2008;157:606-620.
- Stack EC, Kubilus JK, Smith K, Cormier K, Del Signore SJ, Guelin E, Ryu H, Hersch SM, Ferrante RJ. Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Comp Neurol* 2005;490:354-370.
- Stack EC, Dedeoglu A, Smith KM, Cormier K, Kubilus JK, Bogdanov M, Matson WR, Yang L, Jenkins BG, Luthi-Carter R, Kowall NW, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ. Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. *J Neurosci* 2007;27:12908-12915.
- Starling AJ, Andre VM, Cepeda C, De Lima M, Chandler SH, Levine MS. Alteration in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 2005;82:377-386.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcription coactivators. *Cell* 2006;127:397-408.
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol*. 1999;45:25-32.
- Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinas R, et al. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2602-2607.
- Tang TS, Tu H, Orban PC, Chan EY, Hayden MR, Bezprozvanny I. HAP1 facilitates effects of mutant huntingtin on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in primary culture of striatal medium spiny neurons. *Eur J Neurosci* 2004;7:1779-1787.

- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993;72:971-983.
- Traficante A, Riozzi B, Cannella M, Rampello L, Squitieri F, Battaglia G. Reduced activity of cortico-striatal fibres in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neuroreport* 2007;18:1997-2000.
- Van Raamsdonk JM, Warby SC, Hayden MR. Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. *Brain Res Bull* 2007;72:124-131.
- Von Hörsten S, Schmitt I, Nguyen HP, Holzmann C, Schmidt T, Walther T, Bader M, Pabst R, Kobbe P, Krotova J, Stiller D, Kask A, Vaarmann A, Rathke-Hartlieb S, Schulz JB, Grasshoff U, Bauer I, Vieira-Saecker AM, Paul M, Jones L, Lindenberg KS, Landwehrmeyer B, Bauer A, Li XJ, Riess O. Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12:617-24.
- Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:369-384.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985;44:559-577.
- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 2001;12:1393-1407.
- Watzke N, Bamberg E, Grewer C. Early intermediates in the transport cycle of the neuronal excitatory amino acid carrier EAAC1. *J Gen Physiol* 2001;117:547-562.
- Weiss A, Klein C, Woodman B, Sathasivam K, Bibel M, Régulier E, Bates GP, Paganetti P. Sensitive biochemical aggregate detection reveals aggregation onset before symptom development in cellular and murine models of Huntington's disease. *J Neurochem* 2008;104:846-858.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, Gilbert ML, Morton GJ, Bammler TK, Strand AD, Cui L, Beyer RP, Easley CN, Smith AC, Krainc D, Luquet S, Sweet IR, Schwartz MW, La Spada AR. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 2006;4:349-362.

- Wollmuth LP, Kuner T, Seeburg PH, Sakmann B. Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *J Physiol* 1996;491:779-797.
- Yernool D, Boudker O, Jin Y, Gouaux E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 2004;431:811-818.
- Yu ZX, Li SH, Evans J, Pillarisetti A, Li H, Li X. Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci* 2003;23:2193-2202.
- Zabel C, Mao L, Woodman B, Rohe M, Wacker MA, Kläre Y, Koppelstätter A, Nebrich G, Klein O, Grams S, Strand A, Luthi-Carter R, Hartl D, Klose J, Bates GP. A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:720-734.
- Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:41-53.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, et al. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 2002;33:849-860.
- Zuchner T, Brundin P. Mutant huntingtin can paradoxically protect neurons from death. *Cell Death Differ* 2008;15:435-442.

Apéndice 1, Artículo de revisión

- *“Excitotoxic neuronal death in the pathogenesis of Huntington’s disease” Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J y Massieu L. Arch Med Res 2008;39:265-276.*

REVIEW ARTICLE

Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease

Ana María Estrada Sánchez,^a Jana Mejía-Toiber,^b and Lourdes Massieu^a

^aDepartamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

^bDepartamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

Received for publication July 2, 2007; accepted November 15, 2007 (ARCMED-D-07-00296).

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative hereditary illness originated by the mutation of the gene encoding the huntingtin-protein (htt). Mutated htt (mhtt) is characterized by an increased number of glutamine repeats in the N-terminal end; when 40 or more glutamine residues are present, the disease is manifested. Expression of mhtt leads to the selective death of the medium spiny neurons (MSN) in the neostriatum, resulting in the appearance of generalized involuntary movements, the main phenotypic alteration of HD. The relationship between the expression of mhtt and the death of the MSN is not fully understood. Nonetheless, according to experimental evidence indicating that MSN are selectively vulnerable to the toxicity of glutamate (excitotoxicity) or its analogues, excitotoxic neuronal death is suggested to be involved in neurodegeneration associated with HD. Support for this hypothesis comes from studies in HD postmortem tissue and transgenic mice models, suggesting a correlation between mhtt expression and altered glutamatergic neurotransmission, mainly altered conductance of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor subtype and decreased levels of glutamate transporters. On the other hand, alterations in energy metabolism are well documented in HD patients, which might facilitate excitotoxicity. Throughout this review we will discuss relevant evidence suggesting that altered glutamatergic neurotransmission plays a role in neurodegeneration associated with HD, as well as the possible contribution of deficient energy metabolism to the development of an excitotoxic cell death cascade in MSN. We show data supporting protection by energy substrates against neuronal damage in a rat model combining energy deficit and glutamate toxicity. © 2008 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Glutamatergic neurotransmission, Energy deficit, Excitotoxicity, Huntingtin, Energy substrates.

Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder that equally affects men and women. HD occurs when the gene of huntingtin protein (htt), located in the 4p16.3 region of the short arm of chromosome 4, shows an increased number of CAG nucleotides (1,2). Mutant htt (mhtt) contains an elongated N-terminal site characterized by numerous glutamine repeats; when

it shows ≥ 40 glutamine residues the illness is expressed during adulthood. A juvenile form of the disease is observed when the number of glutamine repeats exceeds 60. This is present in 15- to 20-year-old individuals and is characterized by the rapid progression of the illness, the presence of rigidity, seizures, and the accentuated loss of cognitive functions; the death of the patients occurs 7–10 years later (3). HD in adults is characterized by psychiatric disturbances such as irritability, aggressiveness and depression, which precede involuntary motor alterations, the main feature of HD. Progression of motor alterations, also known as choreic movements because of its resemblance to dancing postures, follows three stages. Initially, voluntary movements are accompanied by tremor; progressively, during the

Address reprint requests to: Lourdes Massieu, PhD, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, México D.F. CP 04510, México; E-mail: lmassieu@ifc.unam.mx

second or hyperkinetic phase patients lose their body coordination due to the presence of involuntary abrupt movements (choreic) including the muscles of the limbs, head and trunk, limiting the patient's capacities for daily tasks. A progressive decline in cognitive functions and loss of body weight are also present in this phase. At the final stage, approximately 20 years after its onset, choreic movements are substituted by rigidity and bradykinesia. Death of the patient generally takes place at this stage (4).

The main phenotypic alterations of HD are the consequence of the selective loss of the medium spiny neurons (MSN) in the neostriatum, which include the putamen and the globus pallidus (5,6). The MSN constitute 95% of the total neuronal population and receive cortical inputs releasing glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the mammalian brain. In addition to its role as a neurotransmitter, glutamate can cause the death of neurons through a mechanism known as excitotoxicity (see below). Early studies show that intrastriatal injection of glutamate or some of its analogs such as quinolinic acid and kainic acid induces a similar pattern of neuronal death as described in HD (7–9). Based on this experimental evidence, excitotoxic neuronal death has been suggested to be involved in the pathogenesis of HD. Supporting this hypothesis, modifications in some of the components of glutamatergic neurotransmission have been reported in postmortem studies of HD patients and transgenic models, suggesting that altered glutamatergic transmission might culminate in the development of an excitotoxic mechanism (see below). However, the relationship between excitotoxicity and expression of mhtt is far from being understood. Diverse experimental paradigms from pharmacological approaches to transgenic models have been used in an attempt to understand the mechanisms leading to MSN degeneration in HD. Throughout this review we will discuss the most relevant evidence supporting the role of excitotoxicity in neurodegeneration associated with HD.

Huntingtin Protein and Transgenic Mouse Models

The *htt* gene is constituted by 67 exons, and a polymorphic unstable repeated sequence of CAG nucleotides is located in the first exon (10). The product of this gene is a 348 kDa protein ubiquitously expressed throughout the body. The physiological role of *htt* remains unknown, although it has been related to vesicular transport and to cell transcription (11). The mechanisms underlying the expression of mhtt and the development of the disease are not completely understood. Transgenic mouse models have been useful tools for the study of the biochemical, morphological and functional neuronal changes associated with the expression of mhtt. These are created by the insertion of the full-length gene or the first exon of mhtt. The yeast artificial chromosome (YAC) mouse model expresses the full-length human mhtt gene carrying 46 or 72 CAG repeats (YAC46 and YAC72,

respectively) (12). These mice show several phenotypical alterations resembling those observed in HD patients. The R6 transgenic mice express the first exon of the human mhtt gene carrying ~113 and ~156 CAG repeats, the R6/1 and the R6/2 mice, respectively (13). Like the YAC model, the R6 transgenic mice show some phenotypic features of HD such as motor alterations, cognitive impairment and loss of body weight. Knock-in mice are generated by the insertion of CAG repeats in the endogenous *htt* gene. Several knock-in mice have been developed and both the onset and severity of the phenotypic manifestations differ depending on the number of CAG repeats inserted (14). In spite of the genetic variations in each one of the transgenic models, all develop motor and neurochemical alterations similar to those distinctive in patients.

Glutamatergic Neurotransmission and Excitotoxic Neuronal Death

After its release from synaptic terminals, glutamate activates three different receptor subtypes in postsynaptic neurons: *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors; non-NMDA receptors, sensitive to α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainic acid; and metabotropic receptors. Activation of non-NMDA receptors induces the influx of sodium ions and the subsequent depolarization of the plasma membrane, promoting the extrusion of the magnesium ion normally blocking the NMDA receptor channel. Once the magnesium ion is extruded, binding of glutamate and its co-agonist, glycine, to their respective sites fully activates NMDA receptors, allowing the influx of sodium and Ca^{2+} ions into the cell. Metabotropic receptors are coupled to G-proteins and induce the activation of second messenger systems such as inositol-3-phosphate (IP-3), triggering the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. Some metabotropic receptors are negatively coupled to adenylate cyclase.

The extracellular concentration of glutamate is highly regulated through specific Na^+ -dependent high affinity transporters located both in neurons and glial cells. Five glutamate transporter subtypes have been described: 1) the neuronal excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1); 2) the glutamate-aspartate transporter (GLAST) located mainly in glial cells; 3) the glutamate transporter 1 (GLT-1) located both in neurons and glia; 4) the excitatory amino acid transporter 4 (EAAT4) present in the Purkinje cells in the cerebellum; and the excitatory amino acid transporter 5 (EAAT5) located in the retina (15). Glutamate transport activity depends on the presence of the transmembrane sodium gradient generated by Na^+/K^+ ATPases. Transporters bind one glutamate molecule and two sodium ions externally and translocate them into the cytoplasm, while one potassium ion is extruded to the extracellular medium. Glutamate taken up by glial cells is metabolized to glutamine, which in turn is

released to the extracellular space and taken up by neurons, where it is again converted to glutamate to replenish the neurotransmitter pool (Figure 1). Homeostasis of glutamatergic neurotransmission depends on the coordinated activity of its different components, and failure in any one of them can lead to excitotoxic neuronal damage. Impairment of glutamate removal after its synaptic release leads to the accumulation of the amino acid in the synaptic cleft. The subsequent sustained activation of glutamate receptors may trigger excitotoxic neuronal death, in particular during ATP limiting conditions (16–18).

This type of cell death is dependent on the increase in the intracellular concentration of Ca^{2+} after its influx

through the NMDA receptor channel. Calcium-activated enzymes such as proteases, endonucleases and phospholipases contribute to the degradation of different cell components and neuronal death. Intracellular concentration of Ca^{2+} is regulated by energy-dependent systems (cytoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases). Massive influx of Ca^{2+} ions during excitotoxicity leads to intramitochondrial Ca^{2+} overload, altering its activity and disrupting ATP production (19). As a consequence, ATP-dependent Ca^{2+} loading and extrusion mechanisms are impaired leading to a sustained increase in intracellular Ca^{2+} . Another key event involved in excitotoxic death is the generation of free radicals, as a result of mitochondrial dysfunction

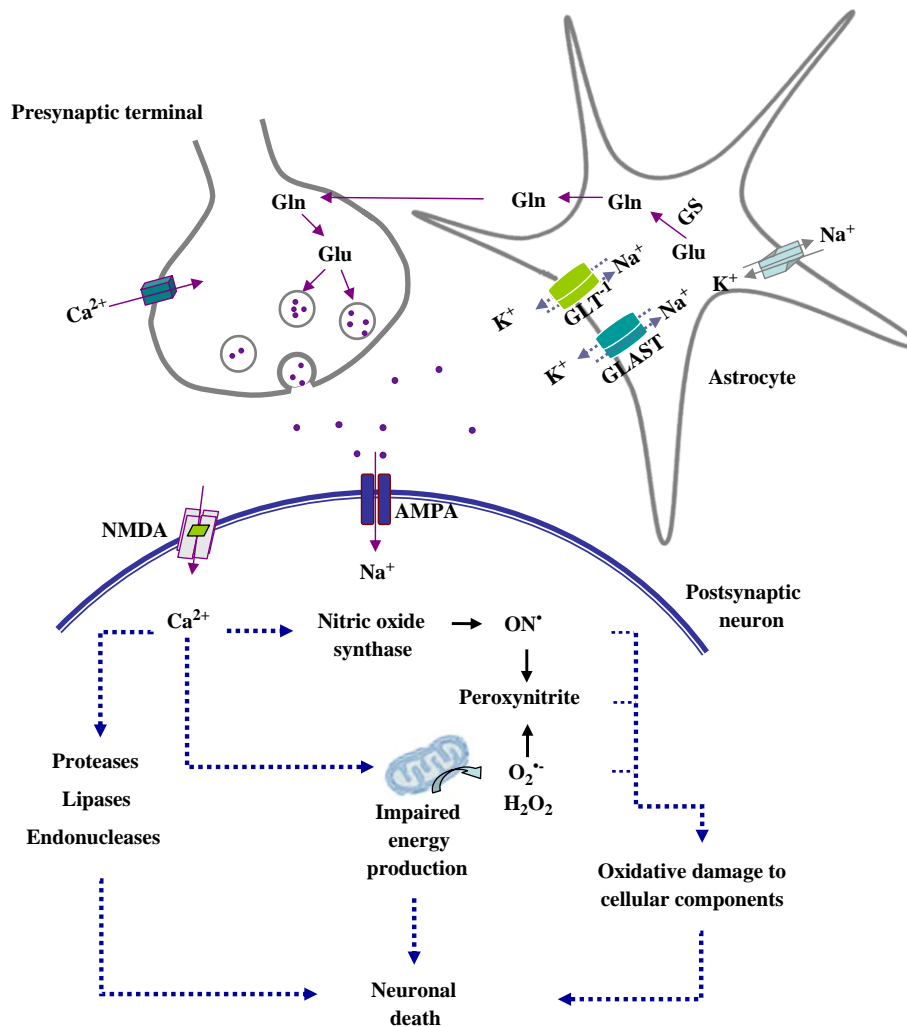


Figure 1. Glutamatergic neurotransmission and the excitotoxic cell death cascade. Depolarization of the presynaptic terminal after the arrival of the synaptic potential induces the influx of calcium and the fusion of vesicles, releasing glutamate to the synaptic cleft. Glutamate activates AMPA receptors on the postsynaptic neuron inducing the influx of sodium and the depolarization of the plasma membrane. The release of magnesium normally blocking the NMDA receptor, leads to its activation and to the influx of calcium into the cell. Glutamate is eliminated from the extracellular medium by specific proteins located both in astrocytes (GLT-1 and GLAST) and in neurons (EAAC1). Glutamate is metabolized to glutamine in glial cells by glutamine synthetase (GS), which is then released and taken up by neurons. Altered glutamate uptake induces glutamate accumulation, which might result in cell death. Massive calcium influx during NMDA receptors overactivation stimulates the activity of diverse enzymes targeting essential components of the cell. Calcium also induces the production of reactive oxygen species, mitochondrial failure and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. Mitochondrial dysfunction might disrupt ATP production contributing to cell death. Color version of this figure available online at www.arcmedres.com

and the activation of Ca^{2+} -dependent enzymes such as xanthine oxidase and nitric oxide synthase (20). Free radicals will damage lipidic and proteic components of the cell as well as nucleic acids, contributing to the neuronal death cascade (Figure 1).

Quinolinic Acid As an Endogenous Excitotoxin in HD

Direct administration of quinolinic acid, an endogenous agonist of NMDA receptors, in the rat striatum causes the death of MSN and reproduces some of the behavioral and biochemical alterations of HD. Quinolinic acid is an endogenous metabolite derived from the kynurenine pathway of tryptophan degradation, and its implication in neuronal death associated with HD has been studied for several years. Postmortem analysis of brains from HD patients at early stages has revealed increased levels of quinolinic acid and its precursor 3-hydroxy-kynurenine (3-HK) (21). Also, increased activity of the enzyme 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase (3-HAO) has been reported in the striatum of postmortem brains (22). This enzyme catalyzes the conversion of 3-hydroxyanthranilic acid to quinolinic acid.

Kynurenic acid (KYNA) is another derivative of the tryptophan degradation pathway, which shows antagonism for NMDA receptors. Reduced KYNA production *in vivo* might increase the toxicity of intrastrially administered quinolinic acid. In fact, reduced levels of KYNA have been observed in some brain regions of severely affected HD patients (23). In contrast, brains from HD patients at the early stage of the disease showed increased levels of this metabolite, similar to the YAC transgenic mice (24). In agreement with these evidences, altered tryptophan metabolism has been reported in HD patients, although the precise role of this alteration on the death of MSN is still unknown. It has been proposed that an imbalance in the quinolinic acid/KYNA ratio might be involved in the pathogenesis of HD. The relationship between mhtt and altered kynurenine pathway is currently being studied.

Alterations in Glutamate Receptors Associated with HD

NMDA Receptors

Functional NMDA receptors are organized in tetrameric structures constituted by the combination of three subunits: NR1, NR2 and NR3. There are four isoforms of the NR2 subunits, NR2A to NR2D, and two of the NR3, NR3A and NR3B. Whereas the binding site of the co-agonist glycine is located in the NR1 subunit, the NR2 subunit contains the glutamate-binding site. A regulatory role has been suggested for the NR3A subunit (25). MSN predominantly affected in HD highly express NR1 and NR2B subunits (26,27). Studies in postmortem tissue from pre-symptomatic

and early symptomatic HD patients showed reduced binding to glutamate receptors in the striatum (28,29) and decreased mRNA levels of the NR1 and NR2 subunits (30), suggesting the loss of neurons containing NMDA receptors. Furthermore, a recent report shows that variations in the genes encoding for the NR2A and NR2B subunits of NMDA receptors can influence the onset of HD (31,32).

A recent publication by Fan and Raymond offers a detailed description of the changes in the expression, function and regulation of NMDA receptors in HD transgenic models (33). Thus, we will describe only some relevant studies to give a general overview of the advances in this field. In R6/2 mice, most of the studies describe either no change or decreased mRNA levels and protein of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor (34–36). In the striatum of these transgenic mice, increased immunocytochemical labeling of the NR1 subunit was observed, whereas diminished immunoreactivity of the NR2A and NR2B subunits was observed (34). Similarly, decreased mRNA levels of the NR2A and NR2B subunits and no change in mRNA of NR1 were described in whole brain in these mice (35). Decreased protein levels of these three subunits were observed in plasma membrane fractions of discrete brain regions, but no significant changes were observed in the striatum. A recent study using striatal dissociated cells from R6/2 mice shows that the percentage of neurons expressing the mRNA of the NR2A subunit is decreased in presymptomatic and symptomatic individuals, whereas a decrease in the mRNA of the NR2B subunit was observed only in the RNA total fraction (36). In the case of the YAC transgenic model, the study by Li et al. described no change in NR1 or NR2B proteins in the striatum of the YAC72 mice as compared to the YAC46 (37), whereas in the YAC128 diminished expression of striatal NR2B has been suggested (33).

Arrangements of the different NMDA receptor subunits will lead to particular functional properties. *In vitro* studies indicate that cells expressing mhtt and the combination of the NR1/NR2B, but not the NR1/NR2A subunits, exhibit an increased NMDA-mediated current (38,39). In the R6/2 mice, reduced NMDA receptor blockade by Mg^{2+} has been observed (40), which is probably related to an altered subunit composition occurring in early stages (36). Similar functional alterations in the NMDA receptor have been described in the YAC mice. Enhanced NMDA-mediated current and neuronal death in MSN from these mice appears to be mediated by receptors containing the NR1/NR2B subunit composition (41). A change in the subunit composition of NMDA receptors might be related to the induction of neuronal death because the presence of receptors containing the NR2B subunit show a slower deactivation kinetics and mediate larger increases in intracellular calcium concentration as compared to receptors containing the NR2A (42). In agreement, increased calcium concentration and

enhanced susceptibility to cell death induced by NMDA in striatal neurons from HD transgenic mice and transfected cells have been reported (34,38,39,41).

However, either no change or diminished expression of the NR2B protein has been observed in transgenic models (34,35,37), suggesting that other mechanisms might be involved in the enhanced activity of NMDA receptors, such as changes in the number of functional receptors present in the cell surface or posttranslational alterations. A recent study has shown increased binding to NMDA, AMPA and metabotropic glutamate receptors, particularly in the hippocampal region of symptomatic 12-month-old YAC128 mice. According to *in situ* hybridization studies, these observations cannot be attributed to changes in mRNA expression but rather to increased protein levels in the synaptosomal fraction, suggesting altered trafficking of receptor subunits (43). In agreement with this hypothesis, a recent study shows a shift of the NR1 and NR2B subunits from the cytosolic compartment to the plasma membrane, as well as a faster rate of insertion of NMDA receptors to the cell surface in YAC72 mice (44).

Altered function of NMDA receptors has been associated with changes in the postsynaptic density protein PSD-95. This is a scaffold protein, which co-localizes with normal htt and interacts with the C terminus of NMDA and kainate receptors (45,46). The interaction between PSD-95 and the NMDA receptor is related to the clustering of receptors on the plasma membrane and the regulation of their activity. An association of htt with PSD-95 and NR1, NR2A and NR2B subunits has been described in human cortical tissue (46). Presence of the polyglutamine-expanded stretch in mhtt alters this interaction inhibiting the binding of normal htt to the scaffold protein. It is suggested that the decreased interaction of htt and PSD-95 will promote the sensitization of NMDA receptors due to enhanced binding of NMDA receptors to PSD-95, increasing excitotoxic neuronal death (46). Finally, some studies have also reported changes in the phosphorylation levels of NMDA receptor subunits. Phosphorylation of NMDA receptors by tyrosine kinases (Src and Fyn) increases NMDA receptor activity and its stabilization in the cell surface. Cell line expression of mhtt increases the levels of phosphorylation of the NR2B subunit, which correlates with increased cell death (47). However, in the case of R6/2 mice, no changes in tyrosine-phosphorylation of NR2A or NR2B have been identified (35). Together these studies suggest that the enhanced activity of NMDA receptors may be the consequence of alterations in receptor trafficking, the number of receptors present in the plasma membrane and subunit phosphorylation.

Therapies Directed to NMDA Receptor Blockade

The alteration in the NMDA receptors described in HD has led to the suggestion of the potentiality of NMDA receptor

antagonists as therapeutic agents for the treatment of HD. To date, diverse clinical trials using NMDA receptor antagonists have been performed in symptomatic HD patients. Preclinical studies show that treatment with the NMDA receptor antagonists amantadine and memantine slow the progression of the illness (48,49), whereas the NMDA receptor antagonists lamotrigine and ketamine had no effect on the progression of the disease, although lamotrigine showed a trend to reduce choreiform movements (50,51). Riluzole, a well-tolerated voltage-dependent sodium channel blocker, which inhibits glutamate release, showed no benefit (52). Remacemide, a non-competitive inhibitor of NMDA receptors, has shown a trend to reduce choreic movements (53). Clinical trials with some of these compounds are currently in progress (54).

Vulnerability of Transgenic Models to NMDA Receptor-mediated Toxicity

Consistent with the hypothesis of enhanced activity of NMDA receptors as a factor involved in the induction of excitotoxicity in HD, *in vitro* studies have shown that cultured MSN from YAC 72 transgenic mice are more susceptible to glutamate and NMDA mediated excitotoxic death (55,56). However, *in vivo* results are controversial. Intra-striatal injection of the NMDA receptor agonist, quinolinic acid, causes extensive neuronal damage in wild-type mice but no neuronal death in the R6 (R6/1 and R6/2) mice (57,58). Likewise, intraperitoneal administration of kainic acid in the R6/2 mouse model has no effect on animal survival or seizure activity, contrary to what is observed in wild-type mice (59). Similarly, cortical cultures from knock-in and R6/2 transgenic mice exposed to NMDA or kainate show the same vulnerability to neuronal damage as control cultures (60). In contrast, in YAC 72 mice quinolinic acid administration induces striatal lesions (41). The discrepancy between these results may be related to the genetic background of the transgenic mice or to the stage of the disease when animals were treated. The reason why animal models exhibiting enhanced NMDA receptor activity do not display neuronal damage when treated with glutamate agonists is still unknown. It has been suggested that some adaptive mechanisms may compensate for the underlying cellular alterations induced by the expression of mhtt. However, these mechanisms have not been elucidated.

Kainate and Metabotropic Glutamate Receptors

Despite the vast studies supporting the contribution of NMDA receptors to the pathophysiology of HD, the roles of kainate, AMPA and metabotropic glutamate receptors to neuronal degeneration have received less attention. However, some evidence suggests that alterations in the gene of

the GluR6/kainate receptor may be involved in HD. Studies show that a polymorphism of an untranslated region of GluR6/kainate receptor gene is related to onset of the illness (61,62). Dysfunction in metabotropic glutamate receptors may also contribute to the pathogenesis of HD (63). Oral administration of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), an inhibitor of mGluR 5 receptors, delays the progression of the illness in R6/2 model (64). It is suggested that mhtt may alter the signaling cascade of mGluR, particularly that of group 1 (mGluR 1 and mGluR 5), which is related to diacylglycerol and IP-3 production. The htt-associated protein-1A (HAP1A) and the IP-3 receptor subtype 1 form a ternary complex, and MSN expressing mhtt exhibit facilitated intracellular calcium release after the stimulation of metabotropic glutamate receptors 1 and 5 (65). The role of mGluR in HD is also supported by experimental HD models where the administration of mGluR antagonists of group 1 reduces the striatal lesion induced by quinolinic acid or NMDA (66,67). Together these studies suggest that alterations in group 1 metabotropic glutamate receptors elicited by mhtt may be involved in the pathogenesis of HD, possibly contributing to the development of the excitotoxic cascade.

Altered Glutamate Transport in HD

Glutamate transporters keep the extracellular concentration of neurotransmitter at physiological levels; uptake failure induces a slow glutamate clearance promoting glutamate spillover and receptor activation. Severe impairment of glutamate uptake induces amino acid accumulation and receptor overactivation, which in turn will trigger an excitotoxic cell death process if sustained long enough. Alterations in glutamate transporters have been described in neurodegenerative disorders related to increased glutamine repeats such as the spinocerebellar ataxia type 7 and HD. Expression of ataxin-7 (a polyglutamine-containing protein associated with the development of type 7 spinocerebellar ataxia) in Bergmann glial cells of the cerebellum alters cellular morphology and glutamate uptake. Interestingly, expression of ataxin-7 reduces the mRNA and protein levels of GLAST, the main glutamate transporter subtype expressed in this glial population, reducing glutamate uptake (68). Similar alterations have been described in HD, suggesting that polyglutamine-expanded proteins alter glutamate transport. Consistently, in membrane preparations of HD post-mortem brains, reduced binding of D-[³H] aspartic acid to high-affinity binding sites has been reported (69), and diminished mRNA of the GLT-1 transporter subtype has also been observed in HD postmortem tissue (30). In agreement, decreased protein levels and mRNA of glutamate GLT-1 have been observed in the striatum and cerebral cortex of pre-symptomatic R6/2 mice (70,71). Furthermore, in brain slices of R6/2 mice, decreased [³H]-glutamate uptake was

recently reported (72). The extracellular concentration of glutamate has been determined in pre-symptomatic R6/2 transgenic mice, showing similarity to that present in wild-type mice (73). However, under depolarizing conditions, *in vivo* glutamate release is larger and returns to basal levels more slowly in the striatum of R6/1 mice than in wild-type animals (74). Because these studies were carried out before the appearance of the phenotypic alterations, results suggest that impaired glutamate reuptake might precede neuronal degeneration.

GLT-1 transporter is located mainly in the plasma membrane of astrocytes, which as the neurons also express the htt protein. The relationship between htt mutation and decreased GLT-1 content has been associated with altered cellular transcription. Mutant htt is cleaved intracellularly in several fragments, which aggregate forming insoluble inclusions located both in the cytoplasm and nucleus (75). Studies in *Drosophila* and mouse transgenic models of HD suggest that nuclear inclusions may alter the transcription of GLT-1 protein (72,76).

Secondary Excitotoxicity As a Pathogenic Mechanism in HD. Role of Energy Metabolism

Glutamate-mediated neuronal death is highly influenced by the energy state of the cell, and even physiological concentrations of glutamate become toxic during energy failure (77–80), causing cell death through a process known as secondary excitotoxicity. Under these circumstances cell death results from facilitated NMDA receptor channel opening under depolarizing conditions. NMDA receptor channel is normally blocked by Mg²⁺ ion in a voltage-dependent manner, and this ion is extruded to the extracellular medium when the plasma membrane is depolarized. The resting membrane potential, sustained through the activity of the Na⁺/K⁺ ATPases (81), will collapse during ATP-limiting conditions such as impaired glycolytic or mitochondrial metabolism, depolarizing the plasma membrane and causing the extrusion of Mg²⁺ ions and the activation of NMDA receptors by ambient glutamate. Previous studies from our group have shown that neuronal death induced by the accumulation of glutamate and aspartate after inhibition of glutamate transporters is facilitated in the striatum of animals previously treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3NP), an irreversible inhibitor of complex II of the mitochondrial electron transport chain (17,18). Similarly, inhibition of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), by iodoacetate (IOA) facilitates neuronal damage induced by glutamate transport inhibition or by the intrastriatal administration of glutamate (77,82) (Figure 2). Mechanisms associated with the increased vulnerability to glutamate toxicity have not been completely elucidated, but recent studies from our group indicate that

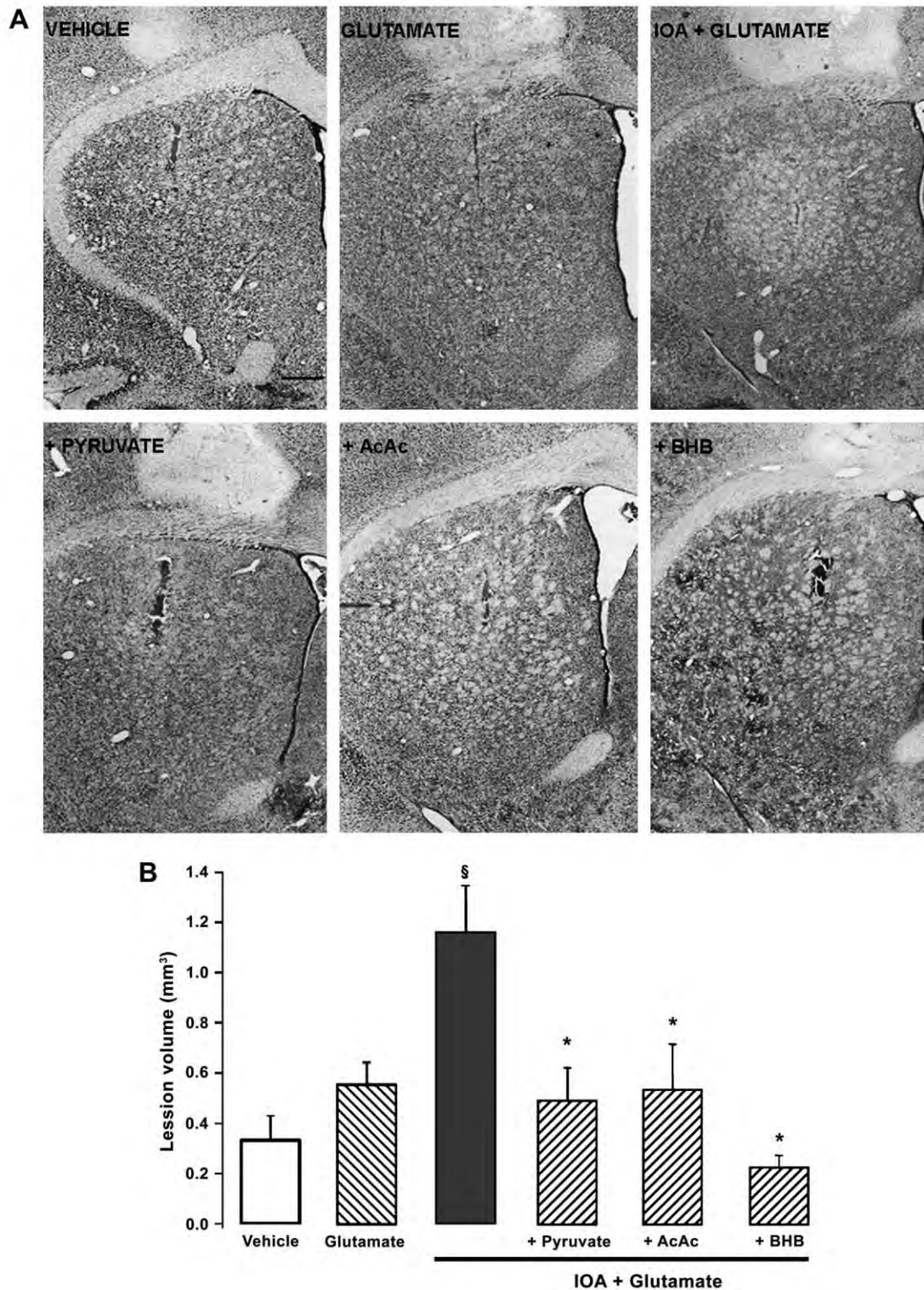


Figure 2. Protective effect of energy substrates against neuronal death induced by glutamate injection (600 nmol/ μ L) in the striatum of rats previously treated with the glycolysis inhibitor IOA (15 mg/kg/day for 3 days) or with vehicle solution (0.9% saline). Forty five minutes after the last IOA injection, acetoacetate (AcAc) (500 μ mol), β -hydroxybutyrate (BHB) (500 μ mol), or pyruvate (50 μ mol) was administered through the lateral vein of the tail at a flux rate of 33 μ L/min (500 μ L total volume). After the administration of energy substrates, glutamate was injected in the right striatum. Twenty four hours later, animals were sacrificed and brains processed for histological analysis. The lesion volume was determined by delimitation of the damaged area (pale zone in micrographs) in Nissl-stained cerebral sections (detailed experimental procedures are described in Reference 82). (A) Representative micrographs of brain sections of the animals treated with the different compounds. In control rats, glutamate injection induces a small lesion (glutamate) similar in size to that induced by saline administration (vehicle). The lesion induced by glutamate is larger in IOA-pretreated animals (IOA + glutamate). The size of the lesion is reduced in rats

IOA treatment induces a decrease in the content of glutamate transporter GLT-1 and an increase in the protein and phosphorylation levels of the NR2B subunit of NMDA receptors (83).

The observations mentioned above are in favor of a close relationship between the energy state of the cell and the induction of excitotoxicity and are relevant to HD neuropathology because impaired energy metabolism has been consistently described in HD patients. Nuclear magnetic resonance studies in non-symptomatic patients reveal reduced glucose uptake in major affected areas (84). Similarly, analysis of symptomatic patients by positron emission tomography suggests reduced glucose metabolism in the striatum and cerebral cortex (85). Increased lactate concentrations have also been observed in the cerebrospinal fluid of HD patients (86). Alterations in the enzymatic machinery involved in ATP production have been described in postmortem tissue. Reduced activity of mitochondrial complexes II, III and IV has been reported in HD patients during the advanced stages of the disease (87). More recently, a reduced cerebral metabolic rate of glucose has been observed in the striatum of early-stage HD patients, suggesting altered glycolytic metabolism (88). These alterations are restricted to the basal ganglia, the brain region mostly affected by the disease. One study revealed a modest but significant decrease in GAPDH activity in postmortem tissue from the caudate (89), and under metabolic stress a reduced GAPDH activity is observed in fibroblasts from HD patients (90). These observations are relevant because GAPDH is a cytoplasmic protein that interacts with mhtt (91), although it is ignored whether this interaction contributes to the pathogenesis of HD. Alterations in other mitochondrial enzymes of the Krebs cycle, such as pyruvate dehydrogenase and aconitase, have also been detected (92,93).

These findings all indicate that alterations in energy metabolism are present in HD patients even prior to the initial manifestations, which may facilitate excitotoxic neuronal damage. Some of the metabolic defects described in post-mortem HD tissue are also present in transgenic mouse models. For example, deficient activity of mitochondrial complex II and aconitase has been identified in R6/2 transgenic mice (94). In addition to the altered function of mitochondrial complexes, mitochondria obtained from lymphoblasts of HD patients and from YAC 72 mice show a partially depolarized membrane potential and a larger depolarization when exposed to Ca^{2+} (95). Altered mitochondrial function is probably related to the direct association of mhtt and mitochondrial components (95–98).

More recently, mitochondrial dysfunction in HD has been related to altered function of PGC-1 α , a transcriptional

co-activator associated with the expression of nuclear-encoded mitochondrial genes (99). Reduced mRNA levels of PGC-1 α have been described in presymptomatic patients, which has been linked to the deficient transcription of PGC-1 α elicited by mhtt (100). HD postmortem tissue and transgenic striatal cells showed a reduced expression of PGC-1 α targets, including those related with mitochondrial genes and some antioxidant enzymes (100–103). These studies link three well-described processes in HD: mitochondrial dysfunction, altered cellular transcription, and oxidative stress.

Together these studies strongly suggest that impairment in ATP production may be present in HD even during early stages. In fact, reduced ATP levels have been described in a HD-derived mouse cell line. Immortalized striatal cells *STHdh^{Q111}* derived from *Hdh^{Q111}* knock-in mice show 1.4-fold less ATP content than control striatal cells and a diminished ATP/ADP ratio (104,105). Based on the studies mentioned above, it can be speculated that altered energy metabolism may enhance NMDA receptor activity during the life span of patients, leading to a progressive excitotoxic process. In favor of this hypothesis, several studies have shown that the chronic administration of the mitochondrial toxin, 3-NP, causes the death of MSN in the striatum of monkeys and rodents and induces some motor alterations resembling those in HD (106,107). Furthermore, neurodegeneration induced by this toxin is mediated by a secondary excitotoxic process (79). Treatment with energy substrates such as creatine, pyruvate and CoQ10 may compensate the energetic abnormalities of MSN and reduce excitotoxicity in patients and HD models (108–112).

Studies from our laboratory have shown that energy substrates such as pyruvate, acetoacetate (AcAc), and β -hydroxybutyrate (BHB) reduce excitotoxic lesions induced by the intracerebral administration of glutamate or glutamate uptake inhibitors (77,82,113). In Figure 2, we show that the intraperitoneal injection of IOA during 3 days enhances the size of glutamate-induced lesions in the rat striatum. Treatment with pyruvate, AcAc, and BHB reduces the lesion volume. This effect may be related to improved mitochondrial metabolism through the conversion of these substrates to acetyl-CoA, enhancing ATP production. This suggestion is supported by the increase in ATP levels observed in the striatum of rats treated with AcAc and BHB. According to the results shown in Table 1, administration of glutamate in the striatum of rats previously treated with IOA causes a 20% reduction in ATP levels, and this effect is prevented in animals receiving ketone body treatment. These results support the therapeutic potential of energy substrates for the treatment of excitotoxic neuronal death.

← treated with energy substrates. Bar = 250 μm . (B) Lesion volume in the striatum of rats treated with the different compounds. § $p < 0.01$ relative to glutamate-induced lesions in vehicle-treated rats (glutamate), * $p < 0.01$ relative to glutamate-induced lesions in IOA-treated rats (IOA + glutamate). Data were analyzed through a one-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc multiple comparison test and data are expressed as means \pm SEM, $n = 4$ –9.

Table 1. Effect of ketone bodies, acetoacetate (AcAc), and β -hydroxybutyrate (BHB) on ATP levels (pmol/ μ g wet weight)

Control	IOA + glutamate	+BHB	+AcAc
2.7 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3	2.5 \pm 0.1	—
2.1 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1*	—	2.0 \pm 0.1

ATP levels were measured by the luciferin-luciferase chemiluminescent assay (Molecular Probes) in the striatum of treated rats 30 min after glutamate injection either in vehicle-injected rats (controls) or rats treated with the glycolysis inhibitor, iodoacetate (IOA). Ketone bodies were administered as described in Figure 2. Data were analyzed through a one-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc multiple comparisons test. Data represent mean \pm SEM, $n = 5$.

*Statistically different with respect to control value ($p < 0.05$).

Conclusions

The most important evidence suggesting the participation of excitotoxicity in neurodegeneration associated with HD comes from early studies showing that the administration of glutamate receptor agonists into the rat striatum causes the death of MSN. Although a direct relationship between mhtt expression and induction of an excitotoxic process in HD has not been confirmed, recent studies have provided significant evidence relating mhtt expression and altered glutamate neurotransmission. Noteworthy, alterations in glutamate transport, glutamate receptors trafficking and functionality, as well as disrupted energy metabolism, may together favor the excitotoxic death of MSN. Other factors not discussed in the present review, including oxidative stress, intracellular and intranuclear mhtt aggregates, altered vesicular trafficking and gene transcription, also played a critical role in the neuropathology of HD.

Acknowledgments

We thank Mrs. Teresa Montiel for technical assistance on figure preparation and experimental procedures. This study was supported by PAPPIT IN213507 (to LM) and CONACYT 194940 fellowship (to AMES).

References

- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983;306:234–238.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993;72:971–983.
- Rasmussen A. Huntington infantil y juvenil. In: Mateos Gómez H, ed. *Enfermedad de Huntington "Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez"*. México, DF: 2000. pp. 22–27.
- Harper SP. *Huntington's Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders;1991. pp. 127–141.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 1985;227:770–773.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985;44:559–577.
- McGeer EG, McGeer PL. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 1976;263:517–519.
- Schwarcz R, Coyle JT. Neurochemical sequelae of kainate injections in corpus striatum and substantia nigra of the rat. *Life Sci* 1977;20:431–436.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Kohler C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 1984;35:19–32.
- Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates PG, Lin SC, Srinidhi J, et al. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 1994;20:27–38.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:919–930.
- Hodgson JG, Apopyan N, Gutekunts CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 1999;23:181–192.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996;87:493–506.
- Menalled LB. Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* 2005;2:465–470.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1–105.
- Massieu L, Montiel T, Del Río P, Hernández K, Haces ML, García O, et al. Role of energy metabolism in neuronal death associated with cerebral ischemia and neurodegenerative diseases, and its prevention by energy substrates. *Recent Res Dev Neurochem* 2003;81–104.
- García O, Massieu L. Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J Neurosci Res* 2001;64:418–428.
- Sánchez-Carbente MR, Massieu L. Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem* 1999;72:129–138.
- Dugan LL, Kim-Han JS. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York: Elsevier Academic Press;2006. pp. 563–569.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 1993;364:535–537.
- Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2004;17:455–461.
- Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell WO. 3-hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4079–4081.
- Sapko MT, Guidetti P, Yu P, Tagle DA, Pellicciari R, Schwarcz R. Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate: implications for Huntington's disease. *Exp Neurol* 2006;197:31–40.
- Guidetti P, Reddy PH, Tagle DA, Schwarcz R. Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model. *Neurosci Lett* 2000;14:233–235.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:327–335.
- Ravenscroft P, Brochie J. NMDA receptors in the basal ganglia. *J Anat* 2000;196:577–585.
- Cepeda C, Wu N, Andre VM, Cummings DM, Levine MS. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007;81:253–271.

28. Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, et al. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 1988;24:981–983.
29. Albin RL, Young AB, Penny JB, Handelin B, Balfour R, Anderson KD, et al. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N Engl J Med* 1990;322:1293–1298.
30. Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease—an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:440–454.
31. Arning L, Kraus PH, Valentin S, Saft C, Andrich J, Epplen JT. NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease. *Neurogenetics* 2005;6:25–28.
32. Arning L, Saft C, Wiczorek S, Andrich J, Kraus PH, Epplen JT. NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease in a sex-specific manner. *Hum Genet* 2007;122:175–182.
33. Fan MMY, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007;81:272–293.
34. Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernandez J, Chandler SH, Leavitt BR, et al. NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res* 2001;66:525–539.
35. Luthi-Carter R, Apostol BL, Dunah AW, DeJohn MM, Farrell LA, Bates GP, et al. Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington's disease mouse brain: analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation. *Neurobiol Dis* 2003;14:624–636.
36. Ali NJ, Levine MS. Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits occur early in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Dev Neurosci* 2006;28:230–238.
37. Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR, et al. Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:1113–1121.
38. Chen N, Luo T, Wellington C, Metzler M, McCutcheon K, Hayden MR, et al. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* 1999;72:1890–1898.
39. Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:41–53.
40. Starling AJ, Andre VM, Cepeda C, De Lima M, Chandler SH, Levine MS. Alteration in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 2005;82:377–386.
41. Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, et al. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 2002;33:849–860.
42. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992;256:1217–1221.
43. Benn CL, Slow EJ, Farrell LA, Graham R, Deng Y, Hayden MR, et al. Glutamate receptor abnormalities in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2007;147:354–372.
44. Fan MM, Fernandes HB, Zhang LYJ, Hayden MR, Raymond LA. Altered NMDA receptor trafficking in a yeast artificial chromosome transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2007;27:3768–3779.
45. Garcia EP, Mehta S, Blair LA, Wells DG, Shang J, Fukushima T, et al. SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 1998;21:727–739.
46. Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 2001;276:24713–24718.
47. Song C, Zhang Y, Parsons CG, Liu YF. Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2003;278:33364–33369.
48. Beister A, Kraus P, Kuhn W, Dose M, Weindl A, Gerlach M. The N-methyl-D-aspartate antagonist memantine retards progression of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl* 2004;68:117–122.
49. Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Dell'Agnello G, Petrozzi L, Rossi G, et al. Amantadine in Huntington's disease: open-label video-blinded study. *Neurol Sci* 2002;23:S83–S84.
50. Murman DL, Giordani B, Mellow AM, Johanns JR, Little RJ, Hariharan M, et al. Cognitive, behavioral, and motor effects of the NMDA antagonist ketamine in Huntington's disease. *Neurology* 1997;49:153–161.
51. Kremer B, Clark CM, Almqvist EW, Raymond LA, Graf P, Jacova C, et al. Influence of lamotrigine on progression of early Huntington disease: a randomized clinical trial. *Neurology* 1999;53:1000–1011.
52. Huntington Study Group. Dosage effects of riluzole in Huntington's disease: a multicenter placebo-controlled study. *Neurology* 2003;61:1551–1556.
53. Kiebertz K, Feigin A, McDermott M, Como P, Abwender D, Zimmerman C, et al. A controlled trial of remacemide hydrochloride in Huntington's disease. *Mov Disord* 1996;11:273–277.
54. Handley OJ, Naji JJ, Dunnett SB, Rosser AE. Pharmaceutical, cellular and genetic therapies for Huntington's disease. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:73–88.
55. Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinas R, et al. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2602–2607.
56. Zeron MM, Fernandes MM, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, et al. Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:469–479.
57. MacGibbon GA, Hamilton LC, Crocker SF, Costain WJ, Murphy KM, Robertson HA, et al. Immediate-early gene response to methamphetamine, haloperidol, and quinolinic acid is not impaired in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci Res* 2002;67:372–378.
58. Hansson O, Petersen A, Leist M, Nicotera P, Castilho RF, Brundin P. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8727–8732.
59. Morton AJ, Leavens W. Mice transgenic for the human Huntington's disease mutation have reduced sensitivity to kainic acid toxicity. *Brain Res Bull* 2000;52:51–59.
60. Snider BJ, Moss JL, Revilla FJ, Lee CS, Wheeler VC, MacDonald ME, et al. Neocortical neurons cultured from mice with expanded CAG repeats in the huntingtin gene: unaltered vulnerability to excitotoxins and other insults. *Neuroscience* 2003;120:617–625.
61. Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, Dodge A, Norbury G, Rosser E, et al. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3872–3876.
62. MacDonald ME, Vonsattel JP, Shrinidhi J, Couropmitree NN, Cuples LA, Bird E, et al. Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 1999;53:1330–1332.
63. Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, et al. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntingtin disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6480–6485.
64. Schiefer J, Sprunken A, Puls C, Lüese HG, Milkereit A, Milkereit E, et al. The metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP and mGluR2 agonist LY379268 modify disease progression in a

- transgenic mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* 2004; 1019:246–254.
65. Tang TS, Tu H, Orban PC, Chan EY, Hayden MR, Bezprozvany I. HAP1 facilitates effects of mutant huntingtin on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in primary culture of striatal medium spiny neurons. *Eur J Neurosci* 2004;7:1779–17787.
 66. Orlando LR, Alsdorf SA, Penney JB, Young AB. The role of group I and group II metabotropic glutamate receptors in modulation of striatal NMDA and quinolinic acid toxicity. *Exp Neurol* 2001;167:196–204.
 67. Bruno V, Ksiazek I, Battaglia G, Lukic S, Leonhardt T, Sauer D, et al. Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology* 2000;39:2223–2230.
 68. Custer AK, Garden GA, Gill N, Reub U, Libby RT, Schultz C, et al. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nature Neurosci* 2006;9:1302–1311.
 69. Cross AJ, Slater P, Reynolds GP. Reduced high-affinity glutamate uptake sites in the brains of patients with Huntington's disease. *Neurosci Lett* 1986;67:198–202.
 70. Behrens PF, Franz P, Woodman B, Lindenberg KS, Landwehrmeyer GB. Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* 2002;125:1908–1922.
 71. Liévens JC, Woodman B, Mahal A, Spasic-Bosovic, Samuel D, Kerkerian-Le Goff, et al. Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2001;8:807–821.
 72. Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 2005;171:1001–1012.
 73. Gianfriddo M, Melani A, Turchi D, Giovannini MG, Pedata F. Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiol Dis* 2004;17:77–88.
 74. Nicniocaill B, Haraldsson B, Hansson O, O'Connor WT, Brundin P. Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2001;13:206–210.
 75. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997;277:1990–1993.
 76. Liévens JC, Rival T, Iche M, Chneiweiss H, Birman S. Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2005;14:713–724.
 77. Massieu L, Gómez-Roman N, Montiel T. *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 2000;165:257–267.
 78. Del Río P, Montiel T, Massieu L. Exacerbation of excitotoxic neuronal death induced during mitochondrial inhibition *in vivo*: relation to energy imbalance. *Neuroscience* 2007;146:1561–1570.
 79. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 1988;451:205–212.
 80. Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* 1998;84:503–510.
 81. Silver IA, Deas J, Erecinska M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience* 1997;78:589–601.
 82. Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L. D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition. *Neurochem Res* 2006;31:1399–1408.
 83. Camacho A, Montiel T, Massieu L. Sustained metabolic inhibition induces an increase in the content and phosphorylation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors and a decrease in glutamate transport in the rat hippocampus *in vivo*. *Neuroscience* 2007;145:873–886.
 84. Kuhl DE, Phelps ME, Markham CH, Metter EJ, Riege WH, Winter J. Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann Neurol* 1982;12:425–434.
 85. Kuwert T, Lange HW, Langen KJ, Herzog H, Aulich A, Feinendegen LE. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 1990;113:1405–1423.
 86. Jenkins BG, Rosas HD, Chen YC, Makabe T, Meyers R, MacDonald M, et al. ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 1998;50:1357–1365.
 87. Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik J, Stephanie C, Berger BS, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 1997;41:646–653.
 88. Powers WJ, Videen TO, Markham J, McGee-Minnich L, Antenor-Dorsey JV, Hershey T, et al. Selective defect of *in vivo* glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2945–2949.
 89. Kish S, Lopes-Cendes I, Guttman M, Furukawa Y, Pandolfo M, Rouleau GA, et al. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. *Arch Neurol* 1998;55:1299–1304.
 90. Cooper AJ, Sheu KF, Burke JR, Strittmatter WJ, Blass JP. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase abnormality in metabolically stressed Huntington disease fibroblasts. *Dev Neurosci* 1998;20:462–468.
 91. Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, et al. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 1996;2:347–350.
 92. Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 1999;45:25–32.
 93. Butterworth J, Yates CM, Reynolds GP. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci* 1985;67:161–171.
 94. Browne SE, Beal MF. The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* 2004;29:531–546.
 95. Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, et al. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 2002;5:731–736.
 96. Goebel HH, Heipertz R, Scholz W, Iqbal K, Tellez-Nagel I. Juvenile Huntington chorea: clinical, ultrastructural, and biochemical studies. *Neurology* 1978;28:23–31.
 97. Yu ZX, Li SH, Evans J, Pillarissetti A, Li H, Li X. Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci* 2003;23:2193–2202.
 98. Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome C release. *Hum Mol Genet* 2004;13:1407–1420.
 99. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004;18:357–368.
 100. Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 2006;127:59–69.
 101. Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 2006;4:349–362.

102. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcription coactivators. *Cell* 2006;127:397–408.
103. McGill JK, Beal MF. PGC-1 α , a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell* 2006;127:465–468.
104. Gines S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, et al. Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum Mol Genet* 2003;12:497–508.
105. Milakovic T, Johnson GV. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 2005;280:30773–30782.
106. Palfi S, Ferrante RJ, Brouillet E, Beal MF, Dolan R, Guyot NC, et al. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996;16:3019–3025.
107. Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Millar JM, et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993;13:4181–4192.
108. Stack EC, Smith KM, Ryu H, Cormier K, Chen M, Hagerty SW, et al. Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:373–380.
109. Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2002;22:1592–1599.
110. Verbessem P, Lemiere J, Eijnde BO, Swinnen S, Vanhees L, Van Leemputte M, et al. Creatine supplementation in Huntington's disease: a placebo-controlled in pilot trial. *Neurology* 2003;61:925–930.
111. Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG. Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2006;141:1835–1848.
112. Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Jenkins BG, Thomas M. Creatine increases survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2001;8:479–491.
113. Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. Beta-amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus *in vivo* and isolated nerve terminals: implications for Alzheimer disease. *Exp Neurol* 2002;176:163–174.

Apéndice 2, Artículo de Revisión 2:

- *“Role of oxidative stress in the pathogenesis of Huntington’s disease” Estrada-Sánchez AM y Massieu L. pp: 21-36 en: New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies 2007. Santamaría A y Jimenez-Capdeville ME.*



New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies, 2007: ISBN: 81-308-0164-7

Editors: Abel Santamaría and María Esther Jiménez-Capdeville

2

Role of oxidative stress in the pathogenesis of Huntington's disease

Ana María Estrada Sánchez and Lourdes Massieu

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, México D.F., CP 04510, México

Abstract

Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative disorder characterized by the presence of involuntary motor movements, dementia, and psychiatric disturbances. The main phenotypic alterations of HD are associated with the death of the medium spiny neurons (MSN) within the neostriatum. HD occurs when the gene of the huntingtin protein (htt) contains an increased number of CAG repeats (>35), which encodes for glutamine (Gln), in the

N-terminal end. The relationship between htt mutation and the selective vulnerability of MSN is far from being understood. However, according to studies in experimental models, transgenic mice, and patients, mitochondrial dysfunction and glutamate-induced excitotoxic neuronal death, are two factors associated with the neurodegeneration observed in HD. On the other hand, oxidative damage might be involved in the pathogenesis of HD since free radical production is associated with mitochondrial dysfunction as well as with the excitotoxic cell death cascade. Here, evidence from transgenic models and HD patients' studies, suggesting that oxidative damage is implicated in the etiology of HD, will be reviewed.

Introduction

Free radicals are normally produced in the entire organism during the electron transport chain in mitochondria or as a consequence of enzymatic activity. In particular, neurons are vulnerable to oxidative stress due its high rate of ATP production in mitochondria. A progressive decline in neuronal antioxidant systems during the life span of an organism or a human being might be involved in oxidative damage and neuronal dysfunction associated with aging and neurodegenerative diseases. On the other hand, a continuous production of free radicals might overcome the antioxidant capacities of the cell and predispose neurons to the toxicity of different agents leading to cell death. As mitochondria is the main source of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), alterations in mitochondrial activity might induce an overproduction of these reactive oxygen species, leading to the generation of other highly reactive species such as the hydroxyl radical ($\bullet OH$) and peroxynitrite ($ONOO^-$).

Alterations in mitochondrial activity have been postulated as a pathogenic factor associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. Therefore, it is expected that free radical production and oxidative damage are also involved in neuronal dysfunction associated with these diseases. On the other hand, increased production of free radicals might damage mitochondrial components impairing its function and compromising ATP production, leading to a vicious cycle. Energy failure might reduce neuronal capability to respond to energy demanding stimuli, such as prolonged excitation. In fact, studies show that neuronal vulnerability to glutamate toxicity is enhanced during conditions of energy failure [1-4], suggesting a close relationship between the energy state of the neuron and its vulnerability to glutamate or glutamate agonists' toxicity.

In addition to its role as a neurotransmitter in the mammalian brain, glutamate induces neuronal death through a process known as excitotoxicity,

which has been related to the pathogenesis of several neuropathologies and neurodegenerative diseases including Huntington's disease (HD) [5]. Excitotoxic neuronal death involves the prolonged activation of glutamate receptors, increased calcium influx, mainly through the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subtype, mitochondrial dysfunction and the generation of reactive oxygen species [6-10]. Since both reduced mitochondrial activity and excitotoxicity are involved in HD, free radical production and oxidative damage to neuronal components, are possibly associated with neuronal dysfunction and neurodegeneration observed during the progression of this devastating disorder.

Huntington's disease

Huntington's disease was formally described by George Huntington in 1872, although earlier observations of HD patients were made by his father and his grandfather during their medical practice in the East Hampton community of Long Island, New York. This neurodegenerative disorder is inherited in an autosomic dominant fashion from parents to offspring and affects equally men and women. It shows a prevalence of 5-10 cases among 100,000 individuals. In México, according to the statistics from the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 8 000 cases of HD have been reported [11]. The genetic origin of this disease relies on the mutation of the gene termed "IT15" located in the 4p16.3 region of the short arm of chromosome number 4, which encodes for the huntingtin protein (htt). This is a 348 KDa protein, which is ubiquitously expressed throughout the body. While the normal protein contains a polymorphic fragment of 3-30 glutamine (Gln) repeats in the N-terminal end, mutant htt (mhtt) shows an expansion at this site with a variable number of Gln repeats [12,13]. An inverse correlation between the number of Gln residues and the onset of the disease has been reported. Individuals carrying alleles with 34 Gln repeats do not express the disease, while those with 35-39 Gln residues express it with incomplete penetrance. Those with a number of 40 Gln residues or above invariably express the illness at the age of 35-40 years and generally die 15-20 years later. The juvenile form of the disease appears when the number of Gln repeats exceeds 60. In these cases the disease progresses more rapidly and the death of patients occurs 7-10 years after the onset of the symptoms.

The disease is characterized by disturbances in cognitive, emotional and motor functions. Psychiatric disturbances precede clinical symptoms and are characterized by irritability, apathy, changes in personality, depression and manic-depressive behaviour. Motor alterations are the classical features of the disease and their progression follows a three-stage pattern. During the first

stage voluntary movements are accompanied by tremor. The second phase is characterized by a loss of coordination and a dramatic increase of involuntary movements of the proximal and distal muscles disabling the patients in their daily tasks. Their severity vary from restlessness with intermittent exaggeration of normal gestures, to violent and abrupt spontaneous movements of all parts of the body including, the muscles of the face, head and trunk. Gait abnormalities are frequently present. These involuntary movements have been defined as choreic, because of their resemblance to dancing postures. The term chorea originates from the Greek word *xopos* and means dance. Also, cognitive capacities progressively decline and are expressed as an impairment of intellectual functions linked to complex tasks, loss of memory and language disturbances, finally culminating in dementia. At the later stage of the disease, approximately 20 years after the onset of illness, chorea disappears and is substituted by rigidity and bradikinesia. Death generally occurs at this stage due to complications related to immobility [14].

Motor alterations are the consequence of the selective loss of neurons in some brain regions involved in motor functions, mainly the neostriatum, which includes the caudate nucleus, the putamen and the globus pallidus. The neostriatum contains diverse neuronal types, but the medium spiny neurons (MSN) constituting the 95% of the total cell population, are the most affected [15]. According to the neuropathological evaluation of HD *postmortem* brains four grades of neuropathology have been established. At the initial phase no neuronal death is visible in the neostriatum (grade 0); during the hyperkinetic phase (grades 1 and 2) a reduction of 50% of the neuronal population in the neostriatum is found. Finally, the akinetic phase correlates with the loss of 95% of the neurons in the neostriatum (grades 3 and 4) [16]. The reason why the expression of mhtt induces specifically the death of MSN is not fully understood. However, deficient energy metabolism and excitotoxic neuronal death have been suggested to play a role. In fact, both conditions promote oxidative stress. Augmented production of free radicals or a decline in antioxidant defense systems related to mhtt expression might render MSN more vulnerable to oxidative damage. Throughout this review we will discuss relevant evidence from HD *postmortem* studies and transgenic mouse models suggesting oxidative stress as a pathological mechanism linked to the etiology of HD.

Huntingtin and transgenic mouse models

The *htt* gene contains 67 exons extending along a segment of 180 kb with a polymorphic unstable repeated sequence of CAG nucleotides encoding for Gln, located in the first exon [17]. The final product of *htt* gene is a protein of 3,144 amino acids, which shows no sequence homology to any other known

protein. To date the physiological role of htt remains unknown, although several functions have been attributed to this protein such as vesicular transport, modulation of the synthesis and release of brain derived neurotrophic factor (BDNF), as well as transcription factor activity [for review see 18].

The physiological role of endogenous htt as well as the consequences of mhTt expression, has been studied in diverse experimental transgenic mice models. The first developed transgenic animal was the R6 mouse, which includes the R6/1 and the R6/2 models, each one expressing the first exon of the human htt gene carrying ~113 and ~156 CAG repeats, respectively. These models progressively show a neurological phenotype reproducing some features of HD. While the R6/1 mice die 10-13 months after the onset of symptoms, the R6/2 mice die 10-13 weeks after the initiation of the phenotypic manifestations [19]. A second HD transgenic model is the yeast artificial chromosome (YAC) mouse model, which expresses the full-length mutant human htt gene, carrying 46 or 72 Gln repeats (YAC46 and YAC72, respectively). Similarly to the R6/2 model, YAC mouse progressively expresses abnormalities in body movements resembling those in HD patients. In this case the phenotypic manifestations initiate 16 weeks and 7 months after birth for YAC72 and YAC46, respectively [20]. While transgenic mice models are generated by the insertion of a fragment or the full-length gene of mhTt, the knockin mice are created by the insertion of the CAG repeats in the endogenous mouse htt gene. Numerous knockin mice have been generated with different numbers of Gln repeats [for review see 21]. In these mice the onset of the phenotypic manifestations varies depending on the number of Gln repeats. Despite the variations among the different transgenic models, all of them develop phenotypic and neuropathologic features resembling those present in HD patients. These models have been a useful tool for the study of the alterations at the cellular level associated with mhTt, which are more limited in *postmortem* brains.

Free radical production and mitochondrial failure in HD

Postmortem examination of HD brains has revealed the presence of some products of oxidative damage on several neuronal components. Particularly, increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (OH8dG), a product of DNA oxidative damage, has been reported in the caudate-putamen from severely affected patients [22]. Similarly, in the mitochondrial fraction from the parietal cortex of late-stage disease patients high levels of OH8dG have been observed. In contrast, no changes in OH8dG levels were found neither in frontal cortex nor in cerebellum of HD patients [23]. In addition, products of lipid peroxidation such as F2-isoprostanes and malondialdehyde have been observed in cerebrospinal fluid of HD patients [24,25]. Despite of these observations,

Alam et al., 2000, did not observe the presence of oxidation products in DNA, protein or lipid components in the brain areas mainly affected in HD [26]. The discrepancy between these studies might be related to the difficulty to evaluate oxidative products or the presence of reactive oxygen species in *postmortem* brains from late-stage disease patients (mainly grade 3 and 4). The presence of a high proportion of dead neurons at late stages of the disease (~95 % of neuronal population in the striatum) might influence the detection of oxidative products. On the other hand, studies in *postmortem* tissue from HD patients at early stages of the disease or in presymptomatic patients might be useful to elucidate whether oxidative stress is an early event in HD.

Indirect evidence suggesting that oxidative damage is involved in HD, is provided by the observation that treatment with antioxidants as d-alpha-tocopherol or lipoic acid reduces motor alterations associated with the early stages of the disease both in patients and transgenic mice [27,28]. It is unknown whether mhtt drives the production of oxidative stress, however, since mitochondria is the major source of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) radical, and its production is increased during mitochondrial dysfunction, possibly the decline in the activity of the electron transport mitochondrial complexes observed in HD is responsible for increased radical production. The deficiency in mitochondrial energy metabolism is a well-documented alteration in HD patients, which is even observed before the phenotypic manifestations of the disease [for review see 29]. Decreased glucose uptake has been described in the caudo-putamen of HD patients [30], as well as increased lactate concentration in the neostriatum and cerebrospinal fluid [31,32]. In fact, decreased activity of mitochondrial complexes II, III and IV in the caudate and the putamen has been described in *postmortem* brain tissue of HD patients [22,33,34]. Moreover, irreversible inhibition of complex II by 3-nitropropionic acid (3-NP), induces similar neurological and phenotypical alterations in monkeys and rodents as those observed in HD patients [35,36]. Altered activity of mitochondrial complexes has also been described in transgenic mice models [37]. Altogether, these evidences suggest that mitochondrial dysfunction correlates with mhtt expression both in HD patients and transgenic mice, probably promoting increased free radical production. Consistent with this suggestion, a recent *in vitro* study shows that the presence of a poly-Gln-containing fragment alters oxygen consumption and induces free radical production in isolated mitochondrial [38]. However, it is unknown how the expression of mhtt is associated with mitochondrial impairment. Possibly, a direct interaction of mhtt with mitochondrial components might be involved, since in brain tissue from a HD patient and transgenic mice, mhtt has been found inside mitochondria in neurons [39-41]. Nonetheless, it is still unknown whether such an interaction is the cause of decreased mitochondrial activity.

It has been demonstrated that during chronic inhibition of complex II of the electron transport chain by the systemic administration of 3-NP, increased formation of 3,4-dihydroxybenzoic acid, an indicator of hydroxyl radical, is present in the striatum of R6/2 transgenic mice as compared to littermate controls [42]. This observation suggests that mitochondria in HD brain show enhanced free radical production when subjected to metabolic stress. On the other hand, it has been shown that fibroblasts' mitochondria from HD patients are less efficient in buffering increased calcium content and in maintaining mitochondrial membrane potential [39]. Altogether, these observations favor the hypothesis that the expression of mhtt is associated with altered mitochondrial function, which might promote free radical production. Thereby, they also suggest that ATP production might be altered in HD neurons. ATP levels have been evaluated in the *STHdh^{Q111}* cells, an immortalized striatal cell line derived from *Hdh^{Q111}* knockin mice, showing a partial reduction in ATP content and a reduced ATP/ADP ratio [43]. In contrast, in the same preparation another study reports no change in ATP levels [44]. More studies are needed in order to elucidate the interplay between mitochondrial activity and mhtt expression and the consequences of such interaction on neuronal integrity. Nonetheless, it might be speculated that altered mitochondrial function in HD will predispose neurons to excitotoxic neuronal death (see below), since mitochondrial integrity is a key factor for cell survival during an excitotoxic challenge. It has been consistently demonstrated that altered mitochondrial activity exacerbates excitotoxic neuronal death [1,2,45-47], possibly involving enhanced free radical production.

Interplay between oxidative damage and excitotoxic neuronal death in HD

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in mammal brain. After its release from presynaptic terminals, glutamate interacts with different receptor subtypes in the post-synaptic neuron: activation of AMPA and kainate receptors (also known as non-NMDA receptors) induces the influx of sodium ions leading to membrane depolarization and to the release of magnesium ion, normally blocking the NMDA receptor channel. NMDA channel opening leads to calcium influx into the cell. Stimulation of metabotropic glutamate receptors coupled to G-proteins induces the activation or inhibition of intracellular signaling pathways [48]. The extracellular concentration of glutamate is highly regulated due to its toxic nature through high affinity sodium-dependent transporters located mainly on glial cells. Glial glutamate transporters GLT-1 and GLAST, and neuronal transporter EAAC1, take up one glutamate molecule and two Na^+ ions into the cell and extrude one K^+ ion [49].

Glutamate is metabolized to glutamine in glial cells, extruded to the extracellular medium and taken up by neurons to refill the neurotransmitter pool. Altered glutamate uptake might induce glutamate extracellular accumulation triggering an excitotoxic cell-death process, as a consequence of the overactivation of glutamate receptors in particular, the NMDA subtype [6,50]. Overactivation of these receptor channels increases intracellular calcium concentration altering mitochondrial calcium homeostasis, promoting the loss of mitochondrial membrane potential and the failure in ATP production. In addition, altered mitochondrial function will enhance free radical production, mainly $O_2^{\cdot -}$ [7]. On the other hand, calcium overload will activate calcium-dependent enzymes such as endonucleases, lipases and nitric oxide synthase (NOS), which produces nitric oxide (NO^{\cdot}). The reaction between NO^{\cdot} with $O_2^{\cdot -}$ produces peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) a powerful oxidant, which might damage the lipidic components of the cells and promote protein tyrosine nitrosylation. Calcium will also activate the xanthine-xanthine oxidase pathway leading to the production of $O_2^{\cdot -}$ radical [51]. As a consequence of all these alterations neuronal death will take place.

Excitotoxic neuronal death has been suggested as a possible pathogenic mechanism involved in HD, due to the fact that glutamatergic agonists such as quinolinic acid and kainic acid, promote selective neuronal death in the rat striatum with histopathological and neurochemical features resembling those observed in HD *postmortem* brains [52-54]. On the other hand, a correlation between diminished mRNA and protein levels of the NR1 and NR2 subunits of the NMDA receptor, and the severity of the disease has been reported [55]. These observations suggest that neurons containing these receptors are damaged in HD. Reduced mRNA and protein levels of the glutamate transporter GLT-1, has also been observed in the striatum and cerebral cortex of HD *postmortem* brains and transgenic mice [56-59]. Therefore, altered removal of glutamate neurotransmitter from the synaptic space is possibly involved in the pathogenesis of HD. On the other hand, increased activation current of NMDA receptors has been observed in cerebral slices from presymptomatic knockin mice and R6/2 transgenic mice [60,61]. Moreover, an interaction of mhht with the postsynaptic density protein PSD-95, a scaffold protein associated with the clustering of NMDA receptors on the plasma membrane, and the regulation of their activity, has been reported [62]. The presence of the poly-Gln-expanded stretch in mhht reduces the interaction between NMDA receptors and PSD-95, prolonging NMDA receptor activity. Together, these results suggest that mhht expression will enhance calcium influx through NMDA receptors, which in concert with altered glutamate removal will trigger excitotoxic neuronal death. Even though, increased excitotoxic neuronal death has been observed in the YAC transgenic mice [63-65], several *in vivo* and *in vitro* studies have reported that HD transgenic

animals are resistant to excitotoxic damage, or show the same susceptibility to glutamate agonists' toxicity than wild type animals [66-70]. In spite of these observations, treatment with NMDA antagonists such as memantine and amantadine reduces the illness progression in HD patients [71,72], supporting the role of excitotoxicity in the disease.

As previously mentioned the excitotoxic death cascade involves impaired intracellular calcium homeostasis, possibly related to increased NMDA receptor activity, and deficient glutamate removal. Deficient mitochondrial calcium handling might also be involved [39] promoting free radical production [7]. Increased NOS expression and activity has been observed in the striatum of symptomatic R6/1 mice, suggesting an overproduction of NO[•] [73]. NO[•] enhanced formation and O₂^{•-} production from damaged mitochondria, would drive ONOO⁻ generation inducing lipid peroxidation and protein nitrosylation. It is noteworthy that a correlation between progressive increase in lipoperoxidation levels in the striatum, and the worsening of the phenotypic alterations in the R6/1 transgenic mice, has been described [74]. Similarly, a progressive increase in the levels of malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, and isoprostane-8-iso-prostaglandin, products of lipoperoxidation, has been reported in the striatum of R6/2 mice [75]. Moreover, increased immunocytochemical detection of 3-nitrotyrosine, an index of protein damage by ONOO⁻, has been detected in the choroid plexus and cerebellum of R6/2 transgenic model [76]. Furthermore, increased free radical generation [77], as well as protein oxidative modification [78] has been observed in R6 transgenic HD models. On the other hand, even in young HD animals, increased basal formation of reactive oxygen species has been associated with mhtt expression, however in these animals the antioxidant systems are apparently still sufficient to counteract oxidative damage. It is suggested that compensatory mechanisms such as increased glutathione levels in cortical and striatal mitochondria [79], and increased striatal SOD activity, particularly Cu/Zn SOD [80] in R6/2 and R6/1 transgenic mice, respectively, might prevent oxidative damage at the early stages. During the progression of the illness a decline in the efficiency of antioxidant enzymes together with other factors, such as intracellular protein aggregation, could influence neuronal vulnerability to oxidative damage.

Evidence suggesting the presence of oxidative damage after the administration of the glutamate analogue, quinolinic acid and the mitochondrial toxin 3-NP in the rat striatum, two-well known models of HD, also support the hypothesis of oxidative stress as a factor involved in the pathogenesis of HD. Quinolinic acid injection in the striatum and its direct exposure to brain synaptosomal preparation, increases lipid peroxidation and promotes the alteration of antioxidant systems, suggesting that quinolinic acid-mediated toxicity is associated with oxidative damage [81,82]. In fact, early production of [•]OH and ONOO⁻ was observed after quinolinic acid infusion in the rat

striatum and the $\cdot\text{OH}$ production was partially attenuated by NMDA receptor antagonists [83,84]. In addition, quinolinic acid-induced oxidative damage was attenuated by the administration of antioxidants [85,86]. On the other hand, increased reactive oxygen species as $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ and cellular oxidative damage was reported after 3-NP treatment [84,87,88]. Both, oxidative damage and the size of the striatal lesions induced by 3-NP, are reduced during treatment with antioxidants [87,89,90]. This evidence suggests that over-activation of NMDA receptors and deficient mitochondrial metabolism, two factors related to HD pathogenesis, lead to free radical production and oxidative damage as a part of their toxic cascade.

Intracellular aggregates and HD pathogenesis

Evaluation of *postmortem* HD brains has revealed the presence of protein aggregates inside the soma and neurites of neurons [91]. Similarly, in HD transgenic mice intracellular aggregates have been observed prior to the phenotypic manifestations of the disease [92]. These aggregates might be in the cytoplasm or even in the nucleus and contain full mhtt, fragments of cleaved mhtt, and ubiquitinated full mhtt or mhtt fragments [93]. More recently, several proteins such as the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), subunits of the proteasome complex and transcription factors have also been found in the intracellular or intranuclear aggregates [94-96]. Based on these observations, it has been suggested that intracellular aggregates might contribute to neuronal dysfunction by interfering with the functionality of some neuronal proteins. In fact, altered expression of the glutamate transporter GLT-1 has been associated with the interruption of its synthesis in glial cells due to intranuclear inclusions [58]. On the other hand, a protective mechanism of intracellular aggregates of mhtt has been proposed. This hypothesis suggests that the aggregation of mhtt prevents its cytoplasmic solubility, limiting their aberrant interaction with other proteins [97]. Possibly, the progressive accumulation of mhtt leads to the destabilization of neuronal functions predisposing cells to toxic stimuli. On the other hand, recent *in vitro* studies have suggested that aggregates might also contribute to the generation of oxidative stress. The toxicity of mhtt aggregates formed by *in vitro* expression of poly-Gln-fragments in neuronal and non-neuronal cells, is associated with increased formation of reactive oxygen species, which can be limited by the use of antioxidants [98,99]. These studies suggest a relationship between intracellular aggregates of mhtt and oxidative stress. Consistent with these observations, a recent study performed in an *in vitro* system, suggests that intracellular aggregates are *per se* free radical production centers, because partial purification of aggregates reveals the presence of oxidized proteins, suggesting that oxidation occurs within the

inclusion bodies [100]. Although, the precise mechanism involved in this process has not been elucidated, the authors suggest that the presence of redox-active transition metals such as iron and copper might be involved. This is suggested because the presence of the metal chelator deferoxamine is able to alter the oxidative potential of aggregates [100]. The contribution of nuclear and cytoplasmic aggregates to neuronal death in HD is not clear, but apparently in addition to their role in altering the functionality of some proteins, they contribute to neuronal damage through the formation of free radicals. However, more studies are needed in order to understand the precise role of aggregates during free radical production, and their relation to the progressive damage of neurons in HD.

Conclusion

According to the studies discussed throughout this review, oxidative stress in HD could be related to altered mitochondrial function, the presence of an excitotoxic cell death cascade and probably to the presence of intracellular aggregates of mhtt protein, three of the major pathogenic factors associated with HD. Although some evidence indicates that oxidative damage is present in late-stage-HD patients, direct evidence of free radical generation is needed to understand the role of oxidative damage in the progression of the illness. On the other hand, transgenic model studies show a correlation between oxidative damage and the progression of the phenotypic manifestations of the illness. This observation suggests oxidative damage as a pathogenic component underlying mhtt expression. However, more studies are needed in order to understand how mhtt leads to the development of oxidative damage. Finally, these studies favor the therapeutic potentiality of antioxidants in the treatment of HD patients.

Acknowledgments

Work supported by PAPPIT IN213507 grant to LM and CONACYT 194940 fellowship to AMES.

References

1. Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G., and Henneberry, R.C. 1998, *Brain Res.*, 451, 205.
2. Greene, J.G., Sheu, S.S., Gross, R.A., and Greenamyre, J.T. 1998, *Neuroscience*, 84, 503.
3. Massieu, L., Gomez-Roman, N., and Montiel, T. 2000, *Exp. Neurol.*, 165, 257.
4. Massieu, L., Del Río, P., and Montiel, T. 2001, *Neuroscience*, 106, 669.
5. Bittigau, P., and Ikonomidou, C. 1997, *J. Child Neurol.*, 12, 471.
6. Choi, D.W. 1987, *J. Neurosci.*, 7, 369.

7. Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., and Bockeaert, J. 1993, *Nature*, 364, 535.
8. Almeida, A., and Bolaños, J.P. 2001, *J. Neurochem.*, 77, 676.
9. Ankarcróna, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., and Nicotera, P. 1995, *Neuron*, 15, 961.
10. Vesce, S., Kirk, L., and Nicholls, D.G. 2004, *J. Neurochem.*, 90, 683.
11. www.innn.edu.mx
12. Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., Young, A.B., Shoulson, I., Bonilla, E., and Martin, J.B. 1983, *Nature*, 306, 234.
13. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993, *Cell*, 72, 971.
14. Harper, S.P. 1991, *Huntington's disease*, W.B. Saunders Company Ltd., London, England.
15. Graveland, G.A., Williams, R.S., and DiFiglia, M. 1985, *Science*, 227, 770.
16. Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. 1985, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1, 113.
17. Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Barnes, G., Bates, P.G., Lin, S.C., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., Altherr, M., Wasmuth, J., Buckler, A., Dcanna, C., Housman, D., Berks, M., Micklem, G., Durbin, R., Dodge, A., Read, A., Gusella, J., and MacDonald, M.E. 1994, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 20, 27.
18. Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. 2005, *Nat. Rev. Neurosci.*, 6, 919.
19. Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., and Bates, G.P. 1996, *Cell*, 87, 493.
20. Hodgson, J.G., Apopyan, N., Gutekunts, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X.J., Stevens, M.E., Rosemond, E., Roder, J.C., Phillips, A.G., Rubin, E.M., Hersch, S.M., and Hayden, M.R. 1999, *Neuron*, 23, 181.
21. Menalled, L.B. 2005, *NeuroRx.*, 2, 465.
22. Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, J., Stephanie, C., Berger, B.S., Muqit, M.M.K., Bird, E.D., and Beal, M.F. 1997, *Ann. Neurol.*, 41, 646.
23. Polidori, M.C., Mecocci, P., Browne, S.E., Senin, U., and Beal, M.F. 1999, *Neurosci. Lett.*, 272, 53.
24. Montine, T.J., Shinobu, L., Montine, K.S., Roberts, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., and Morrow, J.D. 2000, *Ann. Neurol.*, 48, 950.
25. Christofides, J., Bridel, M., Egerton, M., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Stoy, N., Darlington, L.G., and Stone, T.W. 2006, *J. Neurochem.*, 97, 1978.
26. Alam, Z.I., Halliwell, B., and Jenner, P. 2000, *J. Neurochem.*, 75, 840.
27. Peyser, C.E., Folstein, M., Chase, G.A., Starkstein, S., Brandt, J., Cockrell, J.R., Bylsma, F., Coyle, J.T., McHugh, P.R., and Folstein, S.E. 1995, *Am. J. Psychiatry*, 152, 1771.
28. Andreassen, O.A., Ferrante, R.J., Dedeoglu, A., and Beal, M.F. 2001, *Neuroreport*, 12, 3371.
29. Browne, S.E., and Beal, M.F. 2004, *Neurochem. Res.*, 29, 531.
30. Kuhl, D.E., Phelps, M.E., Markham, C.H., Metter, E.J., Riege, W.H., and Winter, J. 1982, *Ann. Neurol.*, 12, 425.
31. Jenkins, B.G., Koroshetz, W.J., Beal, M.F., and Rosen, B.R. 1993, *Neurology*, 43, 2689.

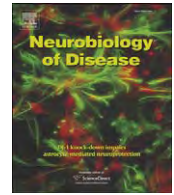
32. Jenkins, B.G., Rosas, H.D., Chen, Y.C., Makabe, T., Meyers, R., MacDonald, M., Rosen, B.R., Beal, M.F., and Koroshetz, W.J. 1998, *Neurology*, 50, 1357.
33. Butterworth, J., Yates, C.M., and Reynolds, G.P. 1985, *J. Neurol. Sci.*, 67, 161.
34. Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. 1996, *Ann. Neurol.*, 39, 385.
35. Palfi, S., Ferrante, R.J., Brouillet, E., Beal M.F., Dolan, R., Guyot, M.C., Peschanski, M., and Hantraye, P. 1996, *J. Neurosci.*, 16, 3019.
36. Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.F., Ferrante, R.J., Kowall, N.M., Miller, J.M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen B.R., and Hyman, B.T. 1993, *J. Neurosci.*, 13, 4181.
37. Tabrizi, S.J., Cleeter, M.W., Xuereb, J., Taanman, J.W., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. 1999, *Ann. Neurol.*, 45, 25.
38. Puranam, K.L., Guanghong, W., Strittmatter, W.J., and Burke, J.R. 2006, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341, 607.
39. Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., and Greenamyre, J.T. 2002, *Nat. Neurosci.*, 5, 731.
40. Yu, Z.Y., Li, S.H., Evans, J., Pillarisetti, A., Li, H., and Li, X.J. 2003, *J. Neurosci.*, 23, 2193.
41. Goebel, H.H., Heipertz, W., Scholz, K., Iqbal, K., and Tellez-Nagel, I. 1978, *Neurology*, 28, 23.
42. Bogdanov, M.B., Ferrante, R.J., Kuemmerle, S., Klivenyi, P., and Beal, M.F. 1998, *J. Neurochem.*, 71, 2642.
43. Gines, S., Seong, I.S., Fossale, E., Ivanova, E., Trettel, F., Gusella, J.F., Wheeler, V.C., Persichetti, F., and MacDonald, M.E. 2003, *Hum. Mol. Genet.*, 12, 497.
44. Milakovic, T., and Johnson, G.V. 2005, *J. Biol. Chem.*, 280, 30773.
45. Massieu, L., Montiel, T., Del Río, P., Hernández, K., Haces, M.L., García, O., Camacho, A., and Mejía, J. 2003, In *Recent Res. Devel. Neurochem.*, 6, 81.
46. Sánchez-Carbente, M.R., and Massieu, L. 1999, *J. Neurochem.*, 72, 129.
47. García, O., and Massieu, L. 2001, *J. Neurosci. Res.*, 64, 418.
48. Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., and Price, D.L. 2006, *Basic Neurochemistry*, Elsevier Academic Press, 563.
49. Danbolt, N.C. 2001, *Prog. Neurobiol.*, 65, 1.
50. Olney, J.W. 1971, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 30, 75.
51. Coyle, J.T., and Puttfarcken, P. 1993, *Science*, 262, 689.
52. Schwarcz, R., and Coyle, J.T. 1977, *Life Sci.*, 20, 431.
53. Schwarcz, R., Foster, A.C., French, E.D., Whetsell, W.O., and Kohler, C. 1984, *Life Sci.*, 35, 19.
54. Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willing, A., Kowall, N.W., and Beal, M.F. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7105.
55. Arzberger, T., Krampl, K., Leimgruber, S., and Weindl, A. 1997, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 56, 440.
56. Behrens, P.F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K.S., and Landwehrmeyer, G.B. 2002, *Brain*, 125, 1908.
57. Liévens, J.C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Boscovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L., and Bates, G.P. 2001, *Neurobiol. Dis.*, 8, 807.
58. Shin, J.Y., Fang, Z.H., Yu, Z.X., Wang, C.E., Li, S.H., and Li, X.J. 2005, *J. Cell. Biol.*, 171, 1001.

59. Nicniocaill, B., Haraldsson, B., Hansson, O., O'Connor, W.T., and Brundin, P. 2001, *Eur. J. Neurosci.*, 13, 206.
60. Cepeda, C., Hurst, R.S., Calvert, C.R., Hernández-Echeagaray, E., Nguyen, O.K., Jocoy, E., Christian, L.J., Ariano, M., and Levine, M.S. 2003, *J. Neurosci.*, 23, 961.
61. Levine, M.S., Klapstein, G., Koppel, A., Gruen, E., Cepeda, C., Vargas, M.E., Jokel, E.S., Carpenter, E.M., Zanzan, H., Hurst, R.S., Efstratiadis, A., Zeitlin, S., and Chasselet, M.F. 1999, *J. Neurosci. Res.*, 58, 515.
62. Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P.H., and Liu, Y.F. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 24713.
63. Zeron, M.M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C., Leavitt, B.R., Brundin, P., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. 2002, *Neuron*, 33, 849.
64. Zeron, M.M., Fernandes, M.M., Krebs, C., Shehadeh, J., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Baimbridge, K.G., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. 2004, *Mol. Cell. Neurosci.*, 25, 469.
65. Tang, T.S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinas, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2602.
66. Hansson, O., Petersen, A., Leist, M., Nicotera, P., Castilho, R.F., and Brundin, P. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8727.
67. McGibbon, G.A., Hamilton, L.C., Crocker, S.F., Costain, W.J., Murphy, K.M., Robertson, H.A., Denovan-Wright, E.M. 2002, *J. Neurosci. Res.*, 67, 372.
68. Petersen, A., Chase, K., Puschban, Z., DiFiglia, M., Brundin, P., and Aronin, N. 2002, *Exp. Neurol.*, 175, 297.
69. Snider, B.J., Moss, J.L., Revilla, F.J., Lee, C.S., Wheeler, V.C., MacDonald, M.E., and Choi, D.W. 2003, *Neuroscience*, 120, 617.
70. Morton, A.J., and Leavens, W. 2000, *Brain Res. Bull.*, 52, 51.
71. Beister, A., Kraus, P., Kuhn, W., Dose, M., Weindl, A., and Gerlach, M. 2004, *J. Neural. Transm. Suppl.*, 117.
72. Lucetti, C., Gambaccini, G., Bernardini, S., Dell'Agnello, G., Petrozzi, L., Rossi G., and Bonuccelli, U. 2002, *Neurol. Sci.*, 23, S83.
73. Pérez-Severiano, F., Escalante, B., Vergara, P., Ríos, C., and Segovia, J. 2002, *Brain Res.*, 951, 36.
74. Pérez-Severiano, F., Ríos, C., and Segovia, J. 2000, *Brain Res.*, 862, 234.
75. Browne, S.E., and Beal, M.F. 2006, *Antioxid. Redox Signal.*, 8, 2061.
76. Deckel, A.W., Gordinier, A., Nuttal, D., Tang, V., Kuwada, C., Freitas, R., and Gary, K.A. 2001, *Brain Res.*, 919, 70.
77. Pérez-Severiano, F., Santamaría, A., Pedraza-Chaverrí, J., Medina-Campos, O., Ríos, C., and Segovia, J. 2004, *Neurochem. Res.*, 29, 729.
78. Perluigi, M., Poon, H.F., Maragos, W., Pierce, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C., and Butterfield, A. 2005, *Moll. Cell Proteom.*, 4, 1849.
79. Choo, Y.S., Mao, Z., Johnson, G.V.W., and Lesort, M. 2005, *Neurosci. Lett.*, 386, 63.
80. Santamaría, A., Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Martínez, E., Maldonado, P., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., and Segovia, J. 2001, *Neurochem. Res.*, 26, 419.
81. Santamaría, A., Galván-Arzate, S., Lisy, V., Ali, S.F., Duhart, H.M., Osorio-Rico, L., Ríos, C., and St'astny, F. 2001, *Neuroreport* 12, 871.

82. Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P.D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, D., Galván-Arzate, S., and Santamaría, A. 2000, *Brain Res.*, 858, 436.
83. Pérez-De La Cruz, V., González-Cortés, C., Galván-Arzate, S., Medina-Campos, O.N., Pérez-Severiano, F., Ali, S.F., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A. 2005, *Neuroscience*, 135, 463.
84. Santamaría, A., Jiménez-Capdeville, E., Camacho, A., Rodríguez-Martínez, E., Flores, A., and Galván-Arzate, S. 2001, *Neuroreport*, 12, 2693.
85. Santamaría, A., Salvatierra-Sánchez, R., Vázquez-Roman, B., Santiago-López, D., Villena-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Jiménez-Capdeville, M.E., and Ali, S.F. 2003, *J. Neurochem.*, 86, 479.
86. Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Pérez, M., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Ortíz-Plata, A., Sánchez-García, A., Villena-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Aguilera, P., and Santamaría, A. 2004, *Neurochem. Int.*, 45, 1175.
87. Fontaine, M.A., Geddes, J.W., Banks, A., and Butterfield, D.A. 2000, *J. Neurochem.*, 75, 1709.
88. Kim, G.M., and Chang, P.H. 2001, *Neurobiol. Dis.*, 8, 114.
89. Kim, G.M., Copin, J.C., Kawase, M., Chen S.F., Sato, S., Gobbel, G.T., and Chan, P.H. J. 2000, *Cereb. Blood Flow Metab.*, 20, 119.
90. Rodríguez-Martínez, E., Rugerio-Vargas, C., Rodríguez, A.I., Borgonio-Pérez, G., and Rivas-Arancibia S. 2004, *Int. J. Neurosci.*, 114, 1133.
91. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. 1997, *Science*, 277, 1990.
92. Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. 1997, *Cell*, 90, 537.
93. Meade, C.A., Deng, Y., Fusco, F.R., Del Mar, N., Hersch, S., Goldowitz, D., and Reiner, A. 2002, *J. Comp. Neurol.*, 449, 241.
94. Nucifora, F.C., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. 2001, *Science*, 291, 2423.
95. Mazzola, J.L., and Sirover, M.A. 2002, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 100, 95.
96. Chai, Y., Koppenhafer, S., Shoemith, S., Pérez, M., and Paulson, H. 1999, *Hum. Mol. Genet.*, 8, 673.
97. Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. 2004, *Nature*, 431, 805.
98. Wyttenbach, A., Sauvageot, O., Carmichel, J., Díaz-Latoud, C., Arrigo, A-P., and Rubinsztein, D.C. 2002, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 1137.
99. Firdaus, W.J., Wyttenbach, A., Díaz-Latoud, C., Currie, R.W., and Arrigo, A-P. *FEBS J.*, 273, 3076.
100. Firdaus, W.J., Wyttenbach, A., Giuliano, P., Kretz-Remy, C., Currie, R.W., and Arrigo, A-P. *FEBS J.*, 273, 5428.

Apéndice 3, Artículo publicado:

- *“Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington’s disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters”.*
Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J y Massieu L. Neurobiol Dis 34:78-86.



Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters

Ana María Estrada-Sánchez^a, Teresa Montiel^a, José Segovia^b, Lourdes Massieu^{a,*}

^a Departamento de Neurociencias Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México D.F. CP 04510, AP 70-253, México

^b Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2008

Revised 10 December 2008

Accepted 15 December 2008

Available online 9 January 2009

Keywords:

Huntington's disease

Excitotoxicity

R6/2 mice

Glutamate transporters

GLT-1

GLAST

Electroencephalogram

ABSTRACT

Glutamate excitotoxicity has been implicated in the neuropathology of Huntington's disease (HD), due to the toxicity of glutamate receptor agonists on striatal medium spiny neurons (MSN), the most affected neuronal population in HD. Previous studies showed functional alterations of NMDA glutamate receptors and decreased expression of glutamate transporters in transgenic models and HD patients, suggesting the presence of excitotoxic damage. We have studied the vulnerability of the striatum to glutamate toxicity in R6/2 mice at 10 and 14 weeks of age. At 10 weeks R6/2 and wild-type mice are equally vulnerable to glutamate toxicity, while at 14 weeks transgenic mice show increased damage, as assessed by Nissl and Fluoro Jade staining. In addition, increased electrical brain activity is observed after glutamate administration in transgenic mice, as monitored electroencephalographically. According to western blot analysis, increased vulnerability to glutamate toxicity correlates with decreased levels of GLT-1 and GLAST glutamate transporters in the striatum.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder associated with an increased number of glutamine repeats in the N-terminal end of the huntingtin protein (mhtt) (Gusella et al., 1983; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). The most vulnerable neuronal population in HD is that of the medium spiny neurons (MSN) within the caudate-putamen (Graveland et al., 1985; Vonsattel et al., 1985). These neurons receive glutamatergic cortical afferents, and are sensitive to the toxicity of glutamate receptor agonists (McGeer and McGeer, 1976; Schwarcz et al., 1983). Thus, excitotoxicity has been implicated in HD neuropathology. Recent observations in transgenic models, *in vitro* studies, and HD patients, reveal alterations in glutamate receptors and transporters (Starling et al., 2005; Ali and Levine, 2006; Arzberger et al., 1997; Nicniocail et al., 2001; Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Shin et al., 2005; Hassel et al., 2008), and blockade of NMDA receptors delays the progression of the disease (Lucetti et al., 2002; Beister et al., 2004). The R6/2 transgenic mice expressing the N-terminal end of human mhtt containing ~156 glutamine repeats (Mangiarini et al., 1996), show increased activation of NMDA receptors *in vitro*, even before the onset

of phenotypic alterations (Cepeda et al., 2003). Likewise, cells expressing mhtt together with the NR1/NR2B subunits of the NMDA receptor, the most abundantly expressed in MSN, show increased current of activation of NMDA receptors (Chen et al., 1999; Zeron et al., 2001). Altogether, these observations suggest that altered functioning of NMDA receptors is involved in excitotoxic neuronal damage in HD. However, other studies have reported that R6/1 and R6/2 mice are not vulnerable to the toxicity of quinolinic acid, an endogenous ligand of NMDA receptors (Hansson et al., 1999, 2001; MacGibbon et al., 2002) suggesting that the correlation between altered NMDA receptor activity and degeneration of MSN in these mice, is complex.

On the other hand, reduced mRNA levels of glutamate transporter 1 (GLT-1) and decreased glutamate uptake have been described in HD *postmortem* tissue (Arzberger et al., 1997; Hassel et al., 2008). Likewise, reduced glutamate uptake has been observed in the striatum and cerebral cortex of R6/2 mice (Nicniocail et al., 2001; Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Shin et al., 2005), suggesting failure of glutamate removal in HD. In fact, up-regulation of GLT-1 attenuates some behavioral alterations in the R6/2 transgenic model (Miller et al., 2008). To further evaluate this hypothesis, we studied the vulnerability of R6/2 mice to the intrastriatal administration of glutamate, and its correlation to the content of the glutamate transporters, GLT-1 and GLAST. Results show that R6/2 mice are more vulnerable to glutamate neurotoxicity than wild-type animals at 14 weeks of age, when a significant decrease in glutamate transporters levels occurs. In addition, intrastriatal glutamate administration induced the appearance of seizure-like activity in transgenic mice but not in wild-type

* Corresponding author. Fax: +52 55/56 22 56 07.

E-mail address: lmassieu@ifc.unam.mx (L. Massieu).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

animals. At 10 weeks of age, no significant changes in glutamate transporters levels were observed, and transgenic and wild-type animals were equally vulnerable to glutamate neurotoxicity. Results support the role of decreased glutamate uptake in the neuropathology of HD.

Materials and methods

All animals were handled according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of laboratory animals (NIH Publications NO. 80-23) and the local Animal Care Committee approved all animal treatments. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. B6CBA female mice carrying ovaries of R6/2 transgenic mice, and wild-type male animals were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and a colony was established at the vivarium of the Instituto de Fisiología Celular at the Universidad Nacional Autónoma de México. Mice were housed and kept under controlled temperature (20–22 °C) with a regulated 12 h light/dark cycle. Genotyping was carried out in DNA samples obtained from ear tissue digested by 1 h incubation at 60 °C with proteinase K (1.68 U per sample) in lysis buffer containing sucrose 0.32 M, Tris-HCl 0.010 M pH 7.5, MgCl₂ 0.005 M and Triton X-100 1% v/v. PCR reactions were carried out in a total volume of 45 µl containing: 1 µl of DNA template, 5% v/v DMSO, 29.2 µl of sterilized water, 5 µl MgCl (10 mM), 1 µl DNP's (10 mM; invitrogen, Carlsbad, CA), 2 µl (10 µM) of each primer, HUN 3 (5'-GCAGCAGCAGCAGCAA-CAGCCGCCACCGCC-3') and HUN 5 (5'-CGGCTGAGGCAGCAGCGCTG-3') (Mangiarini et al., 1996; Segovia, 2002), and 5 µl of PCR-buffer with 1 µl of Taq-polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cycling conditions were: DNA denaturing at 94 °C for 3 min, and 49 cycles of 95 °C for 30 s, 68 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, and a final elongation period of 72 °C during 10 min. Electrophoresis of PCR products was performed in 4.5% agarose gels with 0.1 µg/µl ethidium bromide.

Animal treatment

Ten and 14 week-old R6/2 and wild-type female mice were used throughout the study. Animals were anesthetized with 2–3% halothane in 95%O₂/5% CO₂ mixture and placed on a stereotaxic frame; an anemetric needle was positioned in the right striatum (AP +0.8 mm from bregma, L +2.2 from midline and V -3.2 from dura) according to the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2004). Glutamate monosodium salt (Sigma St. Louis MO, USA) was solubilized in distilled water and a solution containing 500 nmol/0.5 µl (pH 7.0) was prepared. The 500 nmol glutamate dose was selected based on a previous dose–response curve (using 300, 400 and 500 nmol glutamate/0.5 µl) performed in wild-type animals, showing that at this dose a significant lesion was induced in the mouse striatum. According to the results, 24 h after the injection neither 300 nmol nor 400 nmol glutamate induced a lesion significantly different to that observed after saline injection (saline=0.055 ± 0.031 mm³; Glu 300 nmol=0.147 ± 0.008 mm³; Glu 400 nmol=0.123 ± 0.043 mm³; Glu 500 nmol=0.328 ± 0.062 mm³; *p* ≤ 0.05 relative to saline *n* = 3–4, one-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test). Glutamate (500 nmol/0.5 µl) was injected at a rate of 0.175 µl/min with the aid of an injection pump (Harvard apparatus pump model 55, South Natick, MA, USA). Five min after the injection, the needle was gently withdrawn and the skin was sutured. Mice were allowed to recover from anesthesia and placed in individual cages with water and food *ad libitum*.

Histology and quantification of lesion volume

Three or twenty-four hours after glutamate intrastriatal injection mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 25 ml of 0.9% saline solution followed

by 35 ml of 3.7% formaldehyde solution (in 0.1 mM phosphate buffer pH 7.3). Brains were immediately removed and placed in the same fixative solution at 4 °C. Consecutive series of striatal coronal sections of 40 µm (for cresyl violet staining) and of 25 µm (for Fluoro Jade staining) were obtained in a vibratome (Leica VT 1000 s). Lesion size was calculated by examination of all brain sections where neuronal damage was present (observed as a pale area containing pyknotic nuclei and the loss of cell somata). The damaged area was delineated manually and measured with the aid of an image analyzer (NIH Macintosh Image 1.6). Total lesion volume was obtained from the sum of all damaged areas multiplied by the width of the sections (40 µm).

Fluoro Jade staining

Fluoro Jade B (Chemicon Temecula, CA, USA) staining was performed as described by Schmued and Hopkins (2000), with slight modifications. The mounted brain sections (25 µm) were dried at 50 °C for 30 min; afterwards a solution of 1% NaOH diluted in ethanol 80% was added, and 2 min later it was replaced by a 70% ethanol solution. Coverslips were covered with potassium permanganate 0.06% for 10 min, and immediately after, brain sections were washed and incubated with a 0.0004% Fluoro Jade solution dissolved in acetic acid 0.1% during 20 min. Finally, the sections were washed, dried at 50 °C, dehydrated with xylol and covered with permount. Positive cells to Fluoro Jade staining were quantified using the Image Pro Plus 6.0 analyzer program. The total number of positive cells was counted in the striatum from three sections per mouse: the section containing the needle tract (middle section), and the adjacent anterior and posterior sections located 0.180 mm apart from the middle section. On average a total of 6000 (wild-type) to 9000 (transgenic) positive cells were counted per animal. The area of the striatum was measured in each section, and the number of Fluoro Jade positive cells is expressed per unit area (mm²). The average striatal area per section was 5.53 in wild-type mice and 4.92 mm² in transgenic.

Electroencephalographic (EEG) recording

Fourteen week-old male mice were used for EEG recording. For these experiments we used male instead of female mice, because at 14 weeks of age females sustained severe body weight loss and are too weak to resist the implantation of the guide cannula under deep anesthesia, and to survive during one week after the implantation before the EEG recordings. Thirteen week-old male mice were anesthetized with 2–3% halothane in 95%O₂/5% CO₂, and a guide cannula was implanted according to the coordinates: AP +0.8 mm from bregma, L +2.2 from midline and V -2 from dura, taken from the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2004). Epidural electrodes were positioned on the frontal and the parietal cortices of both hemispheres, and were fixed to the skull with dental cement. Mice were allowed to recover from anesthesia in individual cages with *ad libitum* access to food and water. One week after surgery, basal EEG was monitored during 20 min using a Model 79E Grass polygraph (Quincy, MA, USA, filters 0.3–300 Hz) in the awake-freely moving mouse. After this period, glutamate (500 nmol) was injected into the left striatum in a 0.5 µl volume, using a microsyringe inserted into the guide cannula, at a rate of 0.175 µl/min. The EEG was recorded during the following 2 h and data were analyzed calculating the mean latencies to the onset of epileptic discharges and total time showing this activity (measured from the beginning of the hypersynchronous activity to the end of the high amplitude spike train). Twenty four hours after the EEG recording, mice were sacrificed; the left hemisphere was left in formaldehyde solution for cresyl violet and Fluoro Jade staining. The lesion volume was measured in all animals recorded as described above. The right hemisphere was processed for western blot assay (see below).

Western blot analysis

Immunoblot assays of glutamate transporters GLT-1 and GLAST were carried out as previously described, with slight modifications (Camacho et al., 2007). Mice were sacrificed and the brain removed; the striatum and the cerebral cortex were dissected and homogenized in 1:10 (wt/vol) extraction buffer containing Tris-HCl (25 mM) pH 7.5, and protease inhibitor cocktail containing EDTA (final concentration 2 mM; Roche, Mannheim, Germany). Samples were centrifuged at 38,000 rpm at 4 °C during 35 min and pellets were resuspended in 180 μ l of the same buffer. Based on a protein concentration curve previously performed, a concentration of 5 μ g of protein was chosen for the immunodetection of GLAST and GLT-1. Samples were boiled for 3 min and electrophoresed at 70 V during 5 h and then transferred to immobilon-P membrane (Millipore, Bradford MA, USA) during 12 h at 4 °C. Membranes were incubated in medium containing 5% dry milk in Trizma-base buffer saline/Tween 20 (TBS-T; Trizma Base 0.1 M pH 7.2, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%) during 1 h. Later on, membranes were incubated with either GLAST or GLT-1 antibodies (1:3000 for each one; Santa Cruz Biotechnology) for 12 h at 4 °C. Membranes were washed (4 times/5 min) in TBS-T and incubated with the anti-guinea-pig horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10,000 Zymed, Invitrogen, USA) for 1 h. Finally, membranes were washed with TBS-T (4 times/5 min) and incubated with chemiluminescence reagent (ECL™ Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and exposed to X-ray film. Levels of immunoreactivity were quantified densitometrically by an image analyzer (ImageJ). Densitometry analysis was corrected relative to the actin content (1:3000, Chemicon, Millipore) used as loading control. Data represent means \pm SEM of 3–4 animals per each group.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc multiple comparison test to determine the difference between groups. Significant differences between data were considered when $p \leq 0.05$. Data from western blots were analyzed considering the optical density values.

Results

Vulnerability of R6/2 and wild-type mice to glutamate toxicity

Ten week-old transgenic R6/2 and wild-type female animals were intrastrially injected with glutamate (500 nmol/0.5 μ l) or saline solution (0.9%, 0.5 μ l) and 24 h later tissue injury was evaluated in cresyl-violet stained coronal sections. As observed in Fig. 1A, wild-type and transgenic mice showed striatal lesions of 0.24 and 0.35 mm^3 , respectively, which are significantly larger to that shown in saline-injected mice. However, no significant difference was observed in the lesion size between wild-type and transgenic animals. When the total number of damaged cells, positive to Fluoro Jade, was counted in striatal sections 24 h after glutamate injection, a larger number was found in animals injected with glutamate as compared to saline-injected animals (Fig. 1B). Although transgenic animals showed an increased number of Fluoro Jade positive cells relative to wild-type littermates, this difference was not statistically significant. These data suggest that at 10 weeks of age, transgenic and wild-type mice are similarly vulnerable to glutamate toxicity in the striatum.

When glutamate was injected into the striatum of 14 week-old wild-type and R6/2 mice, both animal groups showed larger lesions when compared with 10 week-old animals; however, the lesions in transgenic mice were more extensive, and this effect was statistically significant. Fig. 2A shows representative cresyl violet- and Fluoro Jade-stained-coronal sections from wild-type and transgenic mice,

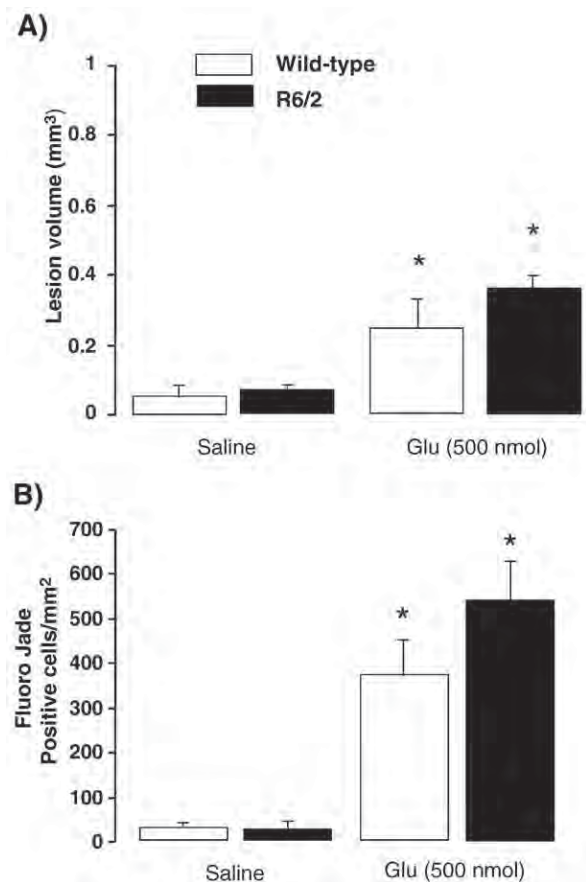


Fig. 1. Glutamate-induced damage in 10 week-old wild-type and R6/2 female mice. Lesion volume (A) and positive Fluoro Jade cells (B) were quantified 24 h after the intrastriatal injection of 500 nmol glutamate or saline solution. Data are means \pm SEM of 3–4 animals per group. * $P \leq 0.05$ relative to saline induced-damage or Fluoro Jade-positive cells.

obtained 24 h after the administration of saline or glutamate solutions. As can be observed, the striatal lesion, as evidenced by the pale region in cresyl violet stained sections (upper panel), is more extended in the R6/2 mice, as well as the tissue area containing damaged cells positive to Fluoro Jade (bottom panel). Graph shows that the lesion volume in transgenic mice was significantly larger (2.1 fold) compared to wild type littermates at this age (0.71 and of 0.33 mm^3 , respectively) (Fig. 2B). The lesion volume was also determined 3 h after glutamate injection. At this time the lesion size was about 2-fold larger in transgenic animals but not significantly different to that observed in wild-type littermates (Fig. 2B). The number of damaged cells positive to Fluoro Jade was counted in tissue sections from animals sacrificed 3 and 24 h after glutamate injection. As observed in Fig. 2C, at three hours, wild-type and transgenic mice showed a similar number of damaged cells, but at 24 h the number of Fluoro Jade-positive cells doubled that present in wild-type mice (Fig. 2C). It is noteworthy that, 12–15 min after glutamate injection, 3 out of 4 transgenic female mice showed behavioral changes associated with hyperexcitability such as head weaving, chewing, grooming and contralateral rotations along the longitudinal axis.

Protein levels of GLT-1 and GLAST glutamate transporters in wild-type and R6/2 transgenic mice

The protein content of GLT-1 and GLAST glutamate transporters was determined by Western blot analysis in the striatum and frontal cortex of 10 and 14 week-old female mice. As shown in Fig. 3A, no difference was observed in GLT-1 levels in wild-type and R6/2 animals

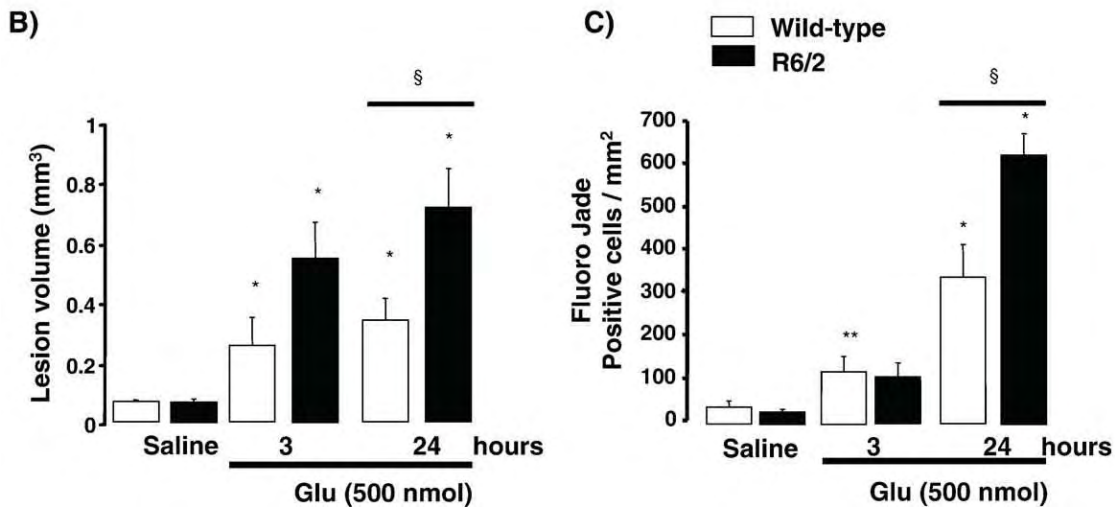
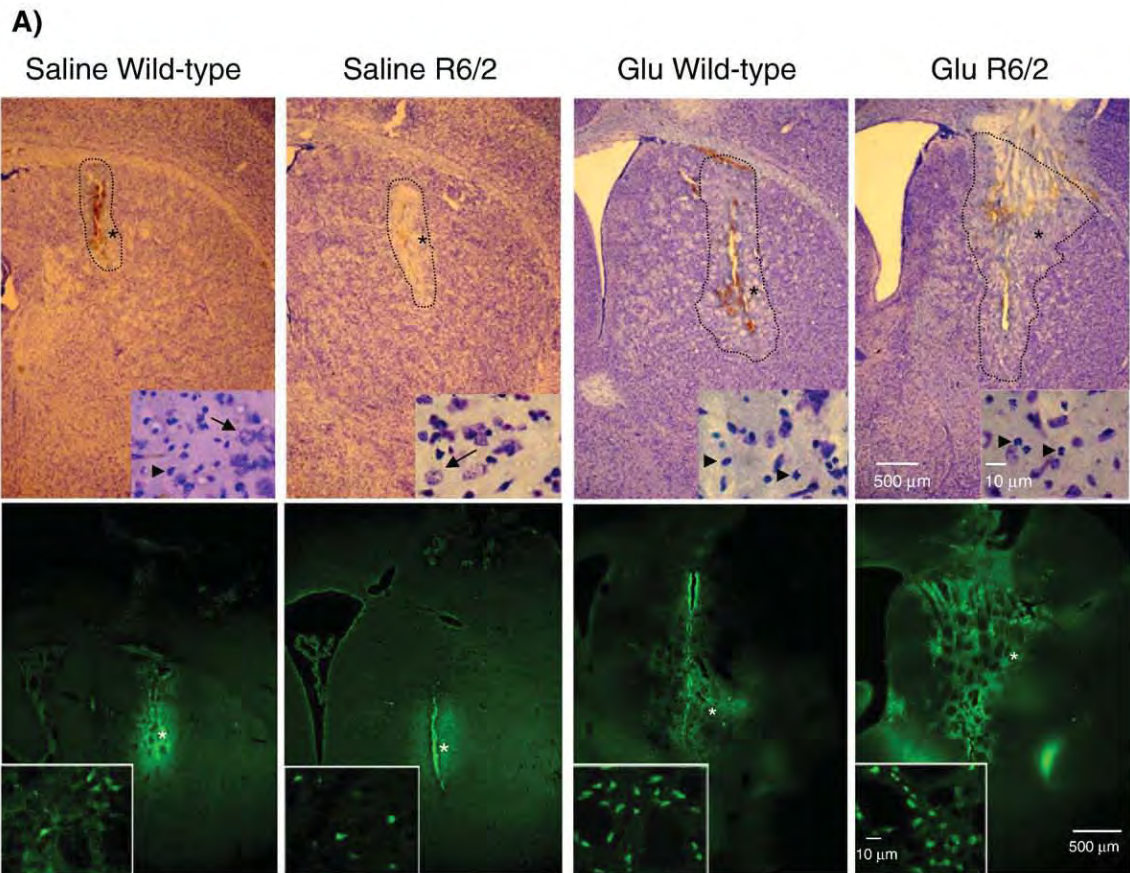
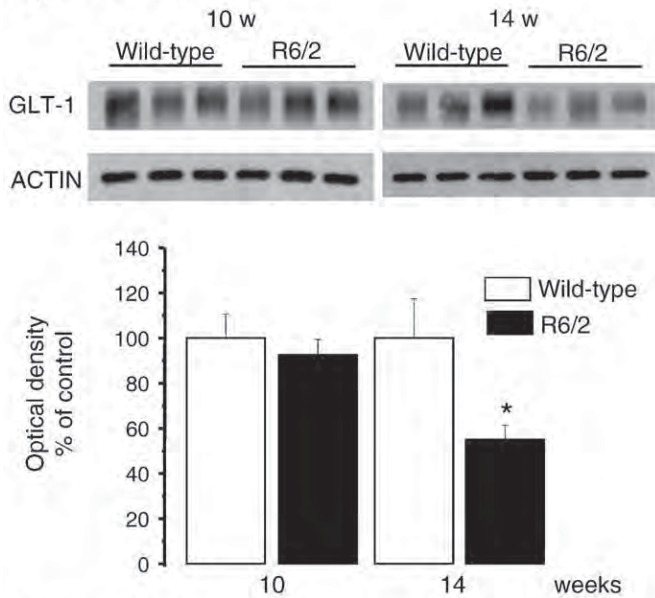


Fig. 2. Glutamate-induced damage in 14 week-old wild-type and R6/2 female mice. (A) Representative micrographs of striatal coronal sections showing the lesion induced by the injection of saline or glutamate (500 nmol) in wild-type and transgenic mice, assessed by Nissl or Fluoro Jade staining. Amplifications show the detailed cell morphology inside the lesion area (indicated by the asterisk); arrows depict normal-appearing cells and arrow-heads indicate pyknotic cells. Fluoro Jade amplifications show the appearance of damaged cells. (B) Lesion volume quantified 3 or 24 h after the intrastratial administration of saline or glutamate (500 nmol). (C) Number of Fluoro Jade-positive cells per mm² as evaluated 3 or 24 h after saline or glutamate injection. Data are means ± SEM of 3–4 animals. * $P < 0.05$ relative to saline, § $P < 0.05$ relative to wild-type animals. Scale bar in amplifications = 500 μm and 10 μm (inset).

at 10 weeks of age, but by 14 weeks, transgenic mice showed a 46% reduction in protein levels in the striatum, compared to wild-type controls. Similar results were observed in the frontal cortex (Fig. 3B). These results agree with previous reports showing a diminished GLT-1 content in R6/2 mice (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Shin et al., 2005).

As in the case of GLT-1, no differences in protein levels of GLAST transporter were observed in 10 week-old animals, but at 14 weeks GLAST levels were 45% reduced both in the striatum and cerebral cortex of transgenic animals (Fig. 4). These data suggest a correlation between striatal vulnerability to glutamate toxicity and the loss of glutamate transporters in R6/2 transgenic mice.

A) STRIATUM



B) CORTEX

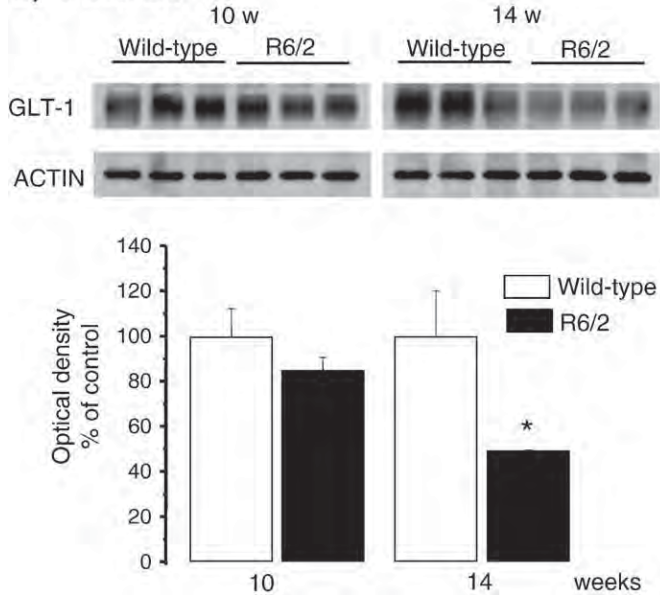


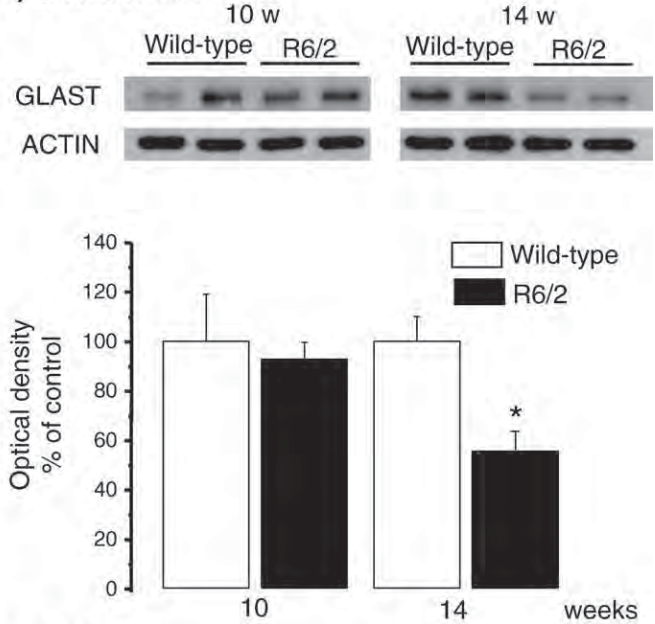
Fig. 3. Protein levels of GLT-1 glutamate transporters in the striatum (A) and cerebral cortex (B) of 10 and 14 week-old wild-type and R6/2 female mice. Representative western blot showing GLT-1 content in the striatum (A) and cerebral cortex (B) as well as actin content used as loading control. Graphs represent the densitometric quantification of the ratio of GLT-1/actin. Data are means \pm SEM of 3 animals per group. * $P < 0.05$ relative to wild-type mice.

EEG recordings

The presence of behavioral changes in transgenic female mice led us to evaluate brain electrical activity after glutamate administration by EEG recording. We used males instead of females for these experiments because they better preserve body weight and size, compared to females, appear healthier and seem to be more resistant to the implantation of the guide cannula than female transgenic mice. Four 13 week-old transgenic male mice were implanted with a guide cannula, and 1 week later EEG recordings were performed. Basal electrical activity was monitored before glutamate injection, and the recordings continued for approximately 2 h after the intrastriatal administration of 500 nmol glutamate. Fig. 5A shows representative

EEG recordings of a wild-type and a R6/2 transgenic mouse, before and after glutamate administration. As can be observed, transgenic animals showed seizures between 7 and 15 min after the administration of glutamate (mean latency 11 ± 1.35 min; Fig. 5A right panel). All transgenic mice injected with glutamate showed signs of hyperexcitability and according to the EEG intense epileptic discharges were present, characterized by hypersynchronous activity and trains of high-amplitude spike waves. Discharges started at the ipsilateral hemisphere and propagated to the contralateral hemisphere. Simultaneously to the appearance of the spike-waves trains, the mice showed behavioral changes including: head weaving, chewing, grooming, contralateral rotations along the longitudinal axis and tonic-clonic

A) STRIATUM



B) CORTEX

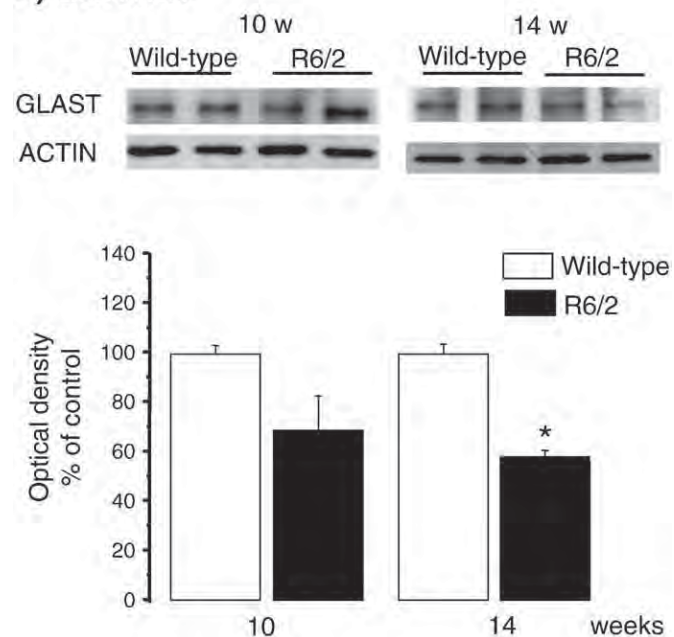


Fig. 4. Representative western blots showing protein levels of GLAST in the striatum (A) and cerebral cortex (B) in 10 and 14 week-old female mice. Graphs show the ratio of GLAST/actin. Data are means \pm SEM of 3 animals per group. * $P < 0.05$ relative to GLAST levels in wild-type mice.

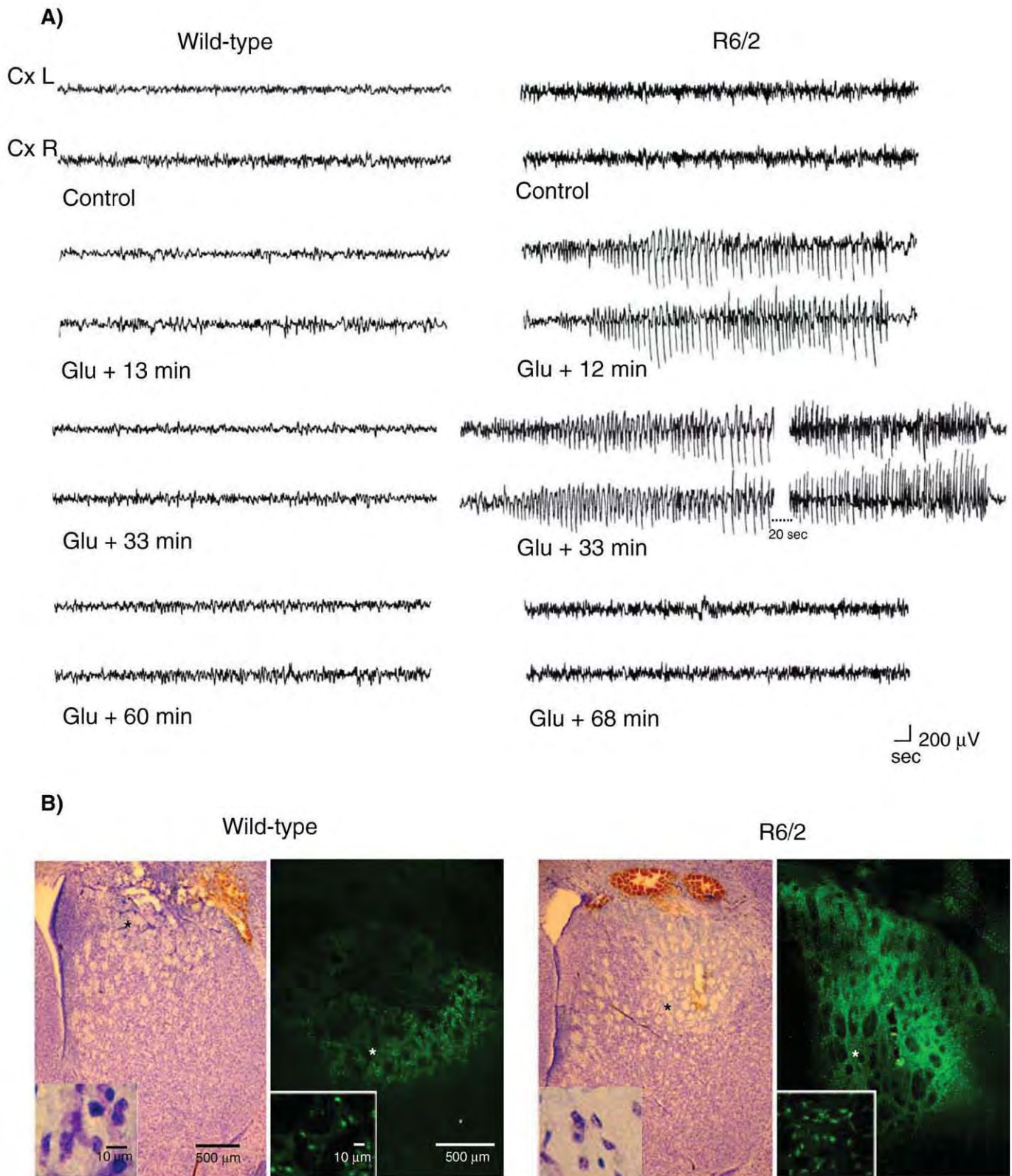


Fig. 5. (A) Representative EEG recordings showing no alterations in electrical activity in the wild-type male mouse as evaluated at different times after glutamate injection. The transgenic male mouse shows hypersynchronous activity and trains of high-amplitude spike waves after glutamate administration. (B) Nissl and Fluoro Jade-stained coronal sections of the same animals shown in (A) depict the extension of the injured area. Amplifications show the detailed cell morphology inside the lesion area. In Fluoro Jade stained sections the scale bar in the inset is the same as in cresyl violet.

seizures, similar to the behavior previously observed in female transgenic mice. EEG alterations lasted from 62–110 min (79 ± 11.88 min); no alterations in the EEG recordings were observed in

transgenic mice from 2 to 24 h after glutamate injection. Wild-type mice did not show behavioral alterations or changes in electroencephalographic activity after the administration of glutamate.

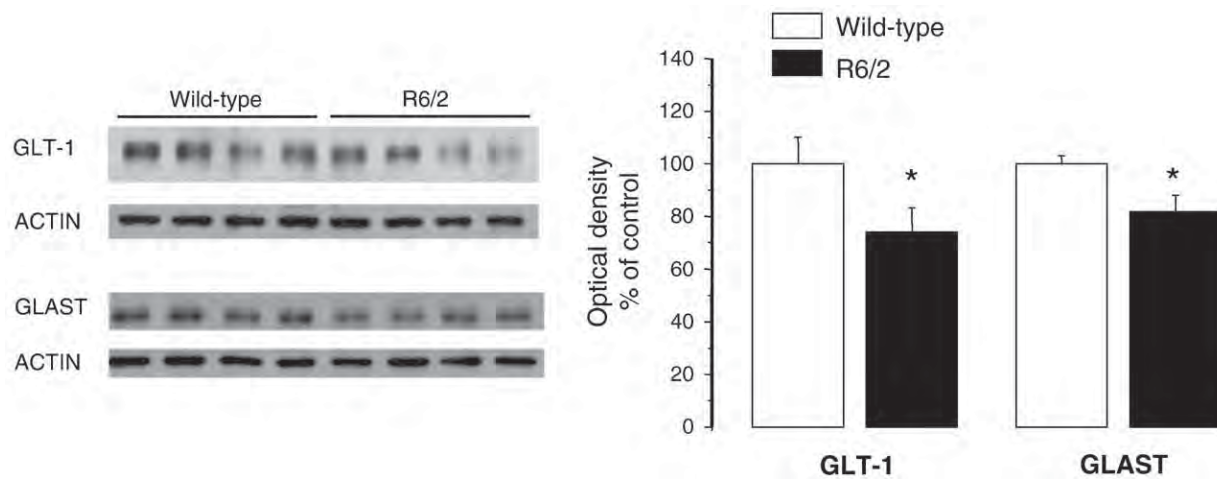


Fig. 6. Protein levels of GLUT-1 and GLAST glutamate transporters in the striatum of both wild type and transgenic male mice used for EEG recordings. Graph show the ratio of GLUT-1/actin and GLAST/actin. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$ relative to wild-type mice.

Twenty-four hours after EEG recordings animals were sacrificed and the brains extracted, the left hemisphere was processed for cresyl violet and Fluoro Jade staining (injected striatum; Fig. 5), while the right hemisphere was used for western blot analysis (contralateral striatum; Fig. 6). Fig. 5B shows coronal sections stained with cresyl violet and Fluoro Jade corresponding to the animals shown in Fig. 5A. As observed in female mice, striatal lesions induced by glutamate were 1.6-fold larger in transgenic mice as compared to wild-type littermates (lesion volume, wild-type mice = $1.32 \pm 0.127 \text{ mm}^3$; R6/2 mice = $2.106 \pm 0.265 \text{ mm}^3$; $p < 0.037$, $n = 4$), and the striatal area showing neurons positive to Fluoro Jade was more extensive. Similarly to female mice, males showed a reduced content of both GLUT-1 and GLAST glutamate transporters in the striatum, according to western blot analysis (Fig. 6).

Discussion

The role of excitotoxic damage in HD was suggested by early studies showing that the administration of the glutamate receptor agonists, kainate and quinolinic acid, in the striatum of rodents induced the death of medium spiny neurons, the most affected neuronal population in HD (McGeer and McGeer, 1976; Schwarcz et al., 1983). In R6/2 transgenic mice the role of excitotoxicity was studied through the administration of kainate and quinolinic acid (Morton and Leavens, 2000; Hansson et al., 2001; MacGibbon et al., 2002). Although, increased vulnerability of transgenic mice to excitotoxic damage was expected in these studies, either decreased or a similar degree of damage, was reported. On the other hand, previous studies reported that the R6/2 mice show reduced levels of the glutamate transporter protein, GLUT-1, from 11–12 weeks of age (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Shin et al., 2005). A reduced content of GLUT-1 mRNA and glutamate uptake has also been observed in HD patients (Arzberger et al., 1997; Hassel et al., 2008). Based on these observations we aimed to study the vulnerability of R6/2 mice to glutamate intra-striatal administration. Glutamate was chosen as excitotoxin because it was reasoned that impaired glutamate removal would render striatal neurons more vulnerable to glutamate toxicity. In addition, glutamate is the major excitatory neurotransmitter in mammalian brain and its administration will activate all its receptors subtypes. Therefore, it is of relevance to study whether impaired clearance of the endogenous neurotransmitter could have a role in HD neuropathology.

Our results show that transgenic mice are more vulnerable than wild-type littermates to glutamate toxicity at 14 weeks of age, while 10 week-old mice show similar vulnerability. Three hours after

glutamate administration, the number of damaged neurons in the striatum of 14 week-old R6/2 and wild-type mice was very similar. At 24 h the number of Fluoro Jade-positive cells increased in transgenic and wild-type littermates, but this increase was larger in R6/2 mice. This observation suggests that between 3 and 24 h after glutamate injection, tissue injury progresses farther away from the injection site in transgenic animals as compared to wild-type. Increased vulnerability to glutamate neurotoxicity correlates with a reduced content of glutamate transporters in the striatum of transgenic animals. At 14 weeks of age a reduction in the protein levels of both the GLUT-1 and GLAST transporters was observed in the striatum of R6/2 mice (~45% for both transporters), while at 10 weeks no changes were detected, suggesting a progressive impairment of glutamate clearance in these animals. From these results we hypothesize that impaired removal of exogenously administered glutamate in transgenic animals, leads to the continuous activation of glutamate receptors and to excitotoxic damage. This hypothesis is supported by the observations from the EEG recordings showing that in transgenic animals, glutamate intra-striatal injection induced epileptic discharges, whereas in wild-type mice glutamate administration did not alter electrical activity. Likewise, western blot analysis confirmed the decrease of GLUT-1 and GLAST transporters in the striatum of these animals, and histological analysis revealed the presence of larger lesions in transgenic male mice as compared to wild-type littermates. Altogether, our results suggest for the first time a strong correlation between reduced glutamate transport and increased vulnerability to glutamate neurotoxicity in the R6/2 strain. Supporting this hypothesis, Miller et al., (2008) have recently shown that up-regulation of GLUT-1 transporter attenuates some of the behavioral alterations in the R6/2 transgenic model, and recent findings show that decortication of glutamatergic projections to the striatum prevents neuronal death and mhtt aggregation, and prolongs the life-span of R6/2 transgenic model (Stack et al., 2007).

In contrast to the observed reduction in GLUT-1, previous reports found no changes in GLAST protein in 11–12 week-old animals (Liévens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Shin et al., 2005). However, these studies were not extended to 14 weeks. Our results show that at this age, there is a significant reduction in the content of both transporter subtypes suggesting progressive alterations in glutamate neurotransmission. Results also suggest that the decrease in GLAST protein occurs later than that in GLUT-1 in the R6/2 mice. Because GLAST transporter is abundantly expressed glial cells of the striatum (Danbolt, 2001), a reduction in its content might contribute to an impaired removal of glutamate from the synaptic space. Therefore, exacerbated glutamate neurotoxicity in 14 weeks-old transgenic

animals might be the consequence of reduced protein levels of both, GLAST and GLT-1 transporters. The present study was focused on the changes in GLT-1 and GLAST because a predominant role of these proteins on glutamate clearance, compared with the part played by EAAC1 transporters, has been previously proposed (Danbolt, 2001), and failure of these transporter subtypes might lead to excitotoxicity (Rothstein et al., 1996). In contrast, a minor contribution of EAAC1 to glutamate removal was suggested by the observation that its down-regulation does not induce neuronal degeneration (Rothstein et al., 1996).

Reduced levels of glutamate transporters, are expected to cause the accumulation of the neurotransmitter in the extracellular space. However, according to microdialysis studies, glutamate levels in the striatum of R6/2 mice at 10–12 weeks of age are not different to the levels reported in wild-type animals (Behrens et al., 2002; Gianfriddo et al., 2004; Traficante et al., 2007). On the other hand, microdialysis studies have suggested diminished glutamate release upon KCl perfusion in the striatum of 12 week-old animals, suggesting impaired neurotransmitter release (Traficante et al., 2007). These observations might suggest that a low concentration of ambient glutamate might be maintained at this stage due to reduced glutamate release or compensatory glutamate uptake by GLAST transporter. Our results show that at 14 weeks when GLT-1 and GLAST levels are significantly reduced, glutamate administration produces an extensive lesion.

A previous study showed decreased vulnerability of 9 week-old R6/2 mice to kainic acid-induced seizures and hippocampal damage (Morton and Leavens, 2000). Similarly, resistance to quinolinic acid neurotoxicity was reported from 6 to 12 weeks of age in R6/2 mice (Hansson et al., 2001; MacGibbon et al., 2002), as well as in 18 week-old presymptomatic R6/1 mice (Hansson et al., 1999). The R6/1 mice model expresses a lower number of CAG repeats (~115 glutamine residues) within the human *mhtt* gene, and the phenotypical alterations progress more slowly appearing after 22–26 weeks (Hansson et al., 1999, 2001). Interestingly, at 22 and 35 weeks of age when R6/1 mice are symptomatic, they are highly resistant to quinolinic acid neurotoxicity (Hansson et al., 2001). The mechanisms underlying resistance to quinolinic acid are unknown, but some compensatory mechanisms might counteract toxicity, including the interaction of *mhtt* with other proteins (for review see Zuchner and Brundin, 2008). In contrast to quinolinic acid, we found an age-dependent increase in striatal vulnerability to glutamate neurotoxicity in the R6/2 mice. This effect might be due to the activation of AMPA, kainate and metabotropic glutamate receptors subtypes in addition to NMDA, by the administration of exogenous glutamate. In agreement with this hypothesis the study by Hansson et al., (2001) reports that 18 week-old R6/1 mice are vulnerable to AMPA intra-striatal toxicity, but not to quinolinic acid injection, suggesting a role of AMPA receptor activation in excitotoxic neuronal death in this strain. We are currently studying the role of AMPA/kainate and metabotropic receptors on glutamate-induced injury in the R6/2 mice.

The R6/2 mice usually show neuronal death at the final stages of the disease (16 weeks) (Mangiarini et al., 1996). According to the present results neuronal death can be precipitated when glutamate is administered to these animals only at late stages, possibly because striatal neurons at this phase are already dysfunctional, as evidenced by the presence of oxidative stress, mitochondrial impairment and *mhtt* aggregates. Bogdanov et al., (1998) showed that 12 week-old R6/2 mice are more vulnerable to the toxicity of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NP) and show increased production of the •OH radical after 3-NP administration. Moreover, at 12 weeks of age R6/2 mice show mitochondrial abnormalities (Tabrizi et al., 2000), and decreased activities of aconitase and mitochondrial complexes II/III and IV, have been demonstrated in the striatum of HD patients, suggesting deficient energy metabolism (Gu et al., 1996; Browne et al., 1997; Browne and Beal, 2006). In addition oxidative stress has been implicated in the neuropathology of HD and a progressive increase in

lipoperoxidation products has been observed in R6/2 mice from 8–14 weeks of age, as well as in oxidative damage to nuclear DNA (Bogdanov et al., 2001; Browne and Beal, 2006), and proteins (Perluigi et al., 2005). Similarly, the R6/1 strain show augmented lipoperoxidation products in the striatum, which parallels the phenotypic alterations of the disease (Pérez-Severiano et al., 2000). Therefore, it is possible that under compromised functioning and impaired glutamate removal, striatal neurons are no longer capable of coping with the continuous activation of glutamate receptors, and thus an excitotoxic cell-death cascade is set in motion. Progressive alterations and decline in defense mechanisms might render striatal neurons more vulnerable to glutamate neurotoxicity. In patients, striatal neurons survive for a long period of time before massive neuronal loss occurs during the hyperkinetic phase, 5–8 years after the initial clinical alterations (Vonsattel et al., 1985; Vonsattel and DiFiglia, 1998). Possibly, at this time neurons might be severely altered, and vulnerable to glutamate-induced excitotoxicity. Thus, excitotoxic damage might be one of the mechanisms precipitating neuronal loss after many years of the disease progression. Treatment with glutamate antagonists has shown some benefit to Huntington's disease's patients reducing the progression of the illness (Lucetti et al., 2002; Beister et al., 2004). Determining the temporality of neuronal vulnerability to excitotoxic damage in patients would be of relevance for the treatment of Huntington's disease with glutamate receptor blockers.

Acknowledgments

Authors thank Dr. Araceli Patrón and Gabriel Orozco for their technical assistance on confocal microscope images, as well to Paula Vergara for her technical support for the PCR assays. This work was supported by PAPIIT (UNAM) IN213507 grant to LM, CONACyT grant 54756 to JS, and CONACyT 194940 fellowship to AM Estrada-Sánchez. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of AM Estrada-Sánchez at the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Ali, N.J., Levine, M.S., 2006. Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits occur early in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Dev. Neurosci.* 28, 230–238.
- Arzberger, T., Krampfl, K., Leimgruber, S., Weindl, A., 1997. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT-1) mRNA expression in Huntington's disease—an in situ hybridization study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 440–454.
- Behrens, P.F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, G.B., 2002. Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* 125, 1908–1922.
- Beister, A., Kraus, P., Kuhn, W., Dose, M., Weindl, A., Gerlach, M., 2004. The N-methyl-D-aspartate antagonist memantine retards progression of Huntington's disease. *J. Neural Transm., Suppl.* 68, 117–122.
- Bogdanov, M.B., Ferrante, R.J., Kuemmerle, S., Klivenyi, P., Beal, M.F., 1998. Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 71, 2642–2644.
- Bogdanov, M.B., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, R.J., Beal, M.F., 2001. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 79, 1246–1249.
- Browne, S.E., Beal, M.F., 2006. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 2061–2073.
- Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, J.M., Berger, S.C., Muqit, M.M.K., Bird, E. D., Beal, M.F., 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41, 646–653.
- Camacho, A., Montiel, T., Massieu, L., 2007. Sustained metabolic inhibition induces an increase in the content and phosphorylation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors and a decrease in glutamate transport in the rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 145, 873–886.
- Cepeda, C., Hurst, R.S., Calvert, C.R., Hernández-Echeagaray, E., Nguyen, O.K., Jocoy, E., Christian, L.J., Ariano, M., Levine, M.S., 2003. NMDA receptor function in mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 66, 525–539.
- Chen, N., Luo, T., Wellington, C., Metzler, M., McCutcheon, K., Hayden, M.R., Raymond, L. A., 1999. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J. Neurochem.* 72, 1890–1898.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- Gianfriddo, M., Melani, A., Turchi, D., Giovannini, M.G., Pedata, F., 2004. Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in

- the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A_{2A} receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiol. Dis.* 17, 77–88.
- Graveland, G.A., Williams, R.S., DiFiglia, M., 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227, 770–773.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39, 385–389.
- Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., Young, A.B., Shoulson, I., Bonilla, E., Martin, J.B., 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234–238.
- Hansson, O., Petersen, A., Leist, M., Nicotera, P., Castilho, R.F., Brundin, P., 1999. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8727–8732.
- Hansson, O., Guatteo, E., Mercuri, N.B., Bernardi, G., Li, X.-J., Castilho, R.F., Brundin, P., 2001. Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioral deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the Huntington gene. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1492–1504.
- Hassel, B., Tessler, S., Faull, R.L., Emson, P.C., 2008. Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochem. Res.* 33, 232–237.
- Liévens, J.C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Bosovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L., Bates, G.P., 2001. Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 8, 807–821.
- Lucetti, C., Gambaccini, G., Bernardini, S., Dell'Agnello, G., Petrozzi, L., Rossi, G., Bonuccelli, U., 2002. Amantadine in Huntington's disease: open-label video-blinded study. *Neurol. Sci.* 23, S83–S84.
- MacGibbon, G.A., Hamilton, L.C., Crocker, S.F., Costain, W.J., Murphy, K.M., Robertson, H. A., Denovan-Wright, E.M., 2002. Immediate-early gene response to methamphetamine, haloperidol, and quinolinic acid is not impaired in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 67, 372–378.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., Bates, G.P., 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493–506.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1976. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263, 517–519.
- Miller, B.R., Dorner, J.L., Shou, M., Sari, Y., Barton, S.J., Sengelaub, D.R., Kennedy, R.T., Rebec, G.V., 2008. Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse. *Neuroscience* 153, 329–337.
- Morton, A.J., Leavens, W., 2000. Mice transgenic for the human Huntington's disease mutation have reduced sensitivity to kainic acid toxicity. *Brain Res. Bull.* 52, 51–59.
- Nicnocioaill, B., Haraldsson, B., Hansson, O., O'Connor, W.T., Brundin, P., 2001. Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* 13, 206–210.
- Paxinos, G., Franklin, K.J., 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press, USA.
- Pérez-Severiano, F., Rios, C., Segovia, J., 2000. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res.* 862, 234–237.
- Perluigi, M., Poon, H.F., Maragos, W., Piece, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C., Butterfield, A., 2005. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in R6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1849–1861.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role of astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Schwarcz, R., Whetsell, W.O., Mangano, R.M., 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219, 316–318.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 874, 123–130.
- Segovia, J., 2002. Transgenic model for the study of oxidative damage in Huntington's disease. *Methods Enzymol.* 353, 365–373.
- Shin, J.Y., Fang, Z.H., Yu, Z.X., Wang, C.E., Li, S.H., Li, X.J., 2005. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J. Cell Biol.* 171, 1001–1012.
- Stack, E.C., Dedeoglu, A., Smith, K.M., Cormier, K., Kubilus, J.K., Bogdanov, M., Matson, W. R., Yang, L., Jenkins, B.G., Luthi-Carter, R., Kowall, N.W., Hersch, S.M., Beal, M.F., Ferrante, R.J., 2007. Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. *J. Neurosci.* 27, 12908–12915.
- Starling, A.J., Andre, V.M., Cepeda, C., De Lima, M., Chandler, S.H., Levine, M.S., 2005. Alteration in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 82, 377–386.
- Tabrizi, S.J., Workman, J., Hart, P.E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 2000. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann. Neurol.* 47, 80–86.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983.
- Traficante, A., Rizzo, B., Cannella, M., Rampello, L., Squitieri, F., Battaglia, G., 2007. Reduced activity of cortico-striatal fibers in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *NeuroReport* 18, 1997–2000.
- Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 1998. Huntington Disease. *J. Exp. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 369–384.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., Richardson, E.P., 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 559–577.
- Zeron, M.M., Chen, N., Moshaver, A., Lee, A.T., Wellington, C.L., Hayden, M.R., 2001. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 41–53.
- Zuchner, T., Brundin, O., 2008. Mutant huntingtin can paradoxically protect neurons from cell death. *Cell Death Differ.* 15, 435–442.

Apéndice 4, manuscrito que contiene los resultados presentados en la segunda parte:

- *“Glycolysis inhibition decreases the levels of glutamate transporters and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington’s disease mice” Estrada-Sánchez AM, Montiel T, y Massieu L. Sometido a Neurochemical Research.*

Dear Professor Lourdes Massieu:

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "Glycolysis inhibition decreases the levels of glutamate transporters and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington's disease mice", which you submitted to *Neurochemical Research*.

Based on the advice received, I feel your manuscript could be accepted for publication should you be prepared to incorporate minor revisions. When preparing your revised manuscript, you are asked to carefully consider the reviewer comments which are attached, and submit a list of responses to the comments. Your list of responses should be uploaded as a file in addition to your revised manuscript.

Abel Lajtha
Editor-in-Chief
Neurochemical Research

Glycolysis inhibition decreases the levels of glutamate transporters and enhances glutamate neurotoxicity in the R6/2 Huntington's disease mice

Ana María Estrada-Sánchez¹, Teresa Montiel¹ and Lourdes Massieu^{1,*}

Excitotoxicity has been associated with the loss of medium spiny neurons (MSN) in Huntington's disease (HD). We have previously observed that the content of glial glutamate transporters diminishes in R6/2 mice at 14 weeks of age but not at 10 weeks, and that this change correlates with an increased vulnerability of striatal neurons to glutamate toxicity. We have also reported that inhibition of the glycolytic pathway decreases glutamate uptake and enhances glutamate neurotoxicity in the rat brain. We now show that at 10-weeks of age, glutamate excitotoxicity is precipitated in R6/2 mice, after the treatment with iodoacetate (IOA), an inhibitor of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). IOA induces a larger inhibition of GAPDH in R6/2 mice, while it similarly reduces the levels of glial glutamate transporters in wild-type and transgenic animals. Results suggest that metabolic failure and altered glutamate uptake are involved in the vulnerability of striatal neurons to glutamate excitotoxicity in HD.

Key words: GAPDH, excitotoxicity, GLT-1, GLAST, iodoacetate

Introduction

An increased number of CAG repeats in the first exon of huntingtin (*htt*) gene leads to the development of Huntington's disease (HD) [1], a chronic neurodegenerative disorder where the medium spiny neurons (MSN) in the caudate-putamen, are the mostly affected [2, 3]. Excitotoxicity has been suggested as a mechanism underlying the loss of MSN in HD, since the administration of the glutamate analogues kainate and quinolinic acid causes severe lesions in the rodent striatum, resembling those observed in HD patients [4, 5]. Supporting this hypothesis, decreased mRNA and protein levels of glutamate transporters have been consistently reported in postmortem brain tissue of HD patients and transgenic models [6-11]. The role of GLT-1 (glutamate transporter 1) on the loss of MSN neurons has recently been suggested because its over expression, reduces the motor alterations

present in R6/2 HD transgenic animals [12]. Moreover, we have recently reported that at 14 weeks of age, the striatum and the cortex of R6/2 mice show decreased levels of the glial transporters, GLT-1 and GLAST (glutamate-aspartate transporter), which correlate with enhanced glutamate neurotoxicity [13]. This evidence suggests that failure of glutamate uptake is a component associated with neuronal loss in HD, possibly contributing to excitotoxic neuronal damage.

Glutamate transporters, mainly those located in glial cells, regulate the extracellular concentration of glutamate preventing its neurotoxicity. Glutamate uptake requires sodium ions, thus, it depends on the sodium gradient and in turn on energy supply [14]. Moreover, it has been shown that glutamate transport stimulates glucose uptake in astrocytes [15-17]. Glucose oxidation through the glycolytic pathway is particularly important, since glutamate

transport inhibitors prevent the stimulation of the glycolytic activity induced by excitatory amino acids [18, 19]. In agreement, glycolysis inhibition impairs glutamate uptake causing the accumulation of this neurotransmitter in the extracellular medium, promoting its toxicity [20-22]. In previous studies we have observed that the continuous inhibition of the glycolytic pathway with iodoacetate, a potent and irreversible inhibitor of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), reduces the protein content of GLT-1 and decreases glutamate uptake in the rat hippocampus *in vivo*. Under this condition, glutamate toxicity is enhanced whenever it is injected into the rat hippocampus or striatum [22-24]. Similarly, the intrastriatal or the intrahippocampal administration of IOA induces the accumulation of glutamate and aspartate in the extracellular medium and generates extensive lesions, which are reduced by the blockade of glutamate receptors, suggesting an excitotoxic mechanism of neuronal death [25-27]. Altogether, this evidence suggests that energy production through the glycolytic pathway is required to ensure the functioning of glutamate transporters, and whenever it is impaired glutamate-mediated toxicity might take place.

Defective glycolytic metabolism has been reported in the striatum of presymptomatic HD patients [28], as well as lactate accumulation in the cerebrospinal fluid [29]. On the other hand, a direct interaction between mutant *htt* (*mhtt*) and GAPDH, possibly affecting its activity, has been described [30, 31]. Based on these observations, we aimed to evaluate whether a sustained inhibition of the glycolytic pathway reduces the content of glutamate transporters and facilitates glutamate neurotoxicity in the striatum of R6/2 mice at 10 weeks of age, a stage when no change in glutamate transporter levels is observed and

animals are equally vulnerable to glutamate toxicity as wild-type littermates [13].

Experimental procedures

Animal treatments

All animals were handled according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of laboratory animals (NIH Publications N0. 80-23), and animal treatments were approved by the local Animal Care Committee. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. B6CBA female mice carrying ovaries of R6/2 transgenic females, and wild-type male animals were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), and a colony was established at the vivarium of the Instituto de Fisiología Celular at the Universidad Nacional Autónoma de México. Mice were housed and kept under controlled temperature (20-22°C) with a regulated 12 h light/dark cycle. Genotyping was carried out in DNA samples obtained from ear tissue as previously described [13]. Ten weeks-old R6/2 and wild-type female mice were used throughout the study. Animals were intraperitoneally injected with either iodoacetate (IOA, 15 mg/Kg, Sigma Aldrich, Toluca México) or vehicle solution (phosphate buffer 10 mM) during three consecutive days. A group of animals was used for the determination of GAPDH activity and Western blot assays (see below), and another one for the intrastriatal administration of glutamate. Two hours after the last injection of IOA or vehicle solution animals were anesthetized with 2-3% halothane in 95% O₂/5% CO₂ mixture and placed on a stereotaxic frame; a unimetrics needle was positioned in the right striatum (coordinates: AP +0.8 mm from bregma, L +2.2 from midline and V -3.2 from dura) according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin [32]. A solution containing 500 nmol/0.5 µl of glutamate

monosodium salt (Sigma Aldrich, Toluca México) pH 7.0 was injected at a rate of 0.175 μ l/min with the aid of an injection pump (Harvard apparatus pump model 55, South Natick, MA, USA). Five min after the injection, the needle was gently withdrawn and the skull was sutured. Mice were allowed to recover from anesthesia and placed in individual cages with water and food *ad libitum*.

Determination of GAPDH activity

GAPDH activity was determined as previous described [22]. Two hours after the third IOA or vehicle injection, brains were extracted and the striatum, the hippocampus and the cerebral cortex were dissected. While the right hemisphere was used for immunoblot assays (see below) the left hemisphere was homogenized in 1:10 (wt/vol) Tris-HCl (0.1 M) pH 8.5, and GAPDH activity was monitored in 1 ml a solution containing (mM): 1.7 arsenic acid, 20 sodium fluoride, 1 NAD⁺ and 5 KH₂PO₄. The reaction was initiated by the addition of glyceraldehyde-3-phosphate (1 mM final concentration). GAPDH activity was estimated by the amount of NADH produced during the first 30 sec, as monitored at 340 nm in the spectrophotometer. The amount of NADH formed in μ mol was calculated using a molar extinction coefficient of 2.07. Protein content was determined by the Bradford's method [33] and data are expressed as μ mol NADH/min/mg protein.

Western blot analysis

Immunoblot assays of glutamate transporters GLT-1 and GLAST were carried out as previous described [13]. Two hours after IOA treatment mice were sacrificed and the brains removed; the striatum and cerebral cortex of the right hemisphere were dissected and homogenized in 1:10 (wt/vol) extraction buffer containing Tris-HCl (25 mM) pH 7.5 and a cocktail of

protease inhibitors containing EDTA (final concentration 2 mM; Roche, Mannheim, Germany). Samples were centrifuged at 38,000 rpm at 4°C during 35 minutes and pellets were resuspended in 180 μ l of the same buffer. Samples (5 μ g of protein) were electrophoresed at 70 V during 5 hours and then transferred to an immobilon-P membrane (Millipore, Bedford MA, USA) during 12 h at 4°C. Membranes were incubated in medium containing 5% dry milk in Trizma-base buffer saline/Tween 20 (TBS-T; Trizma Base 0.1 M pH 7.2, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%) during 1 h. Later on, membranes were incubated with either GLAST or GLT-1 antibody (1:3,000 for each one; Chemicon, Millipore) for 12 h at 4°C. Membranes were washed (4 times/5 min) in TBS-T and incubated with anti-guinea-pig horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10,000 Zymed, Invitogen, USA) for 1 h. Finally, membranes were washed with TBS-T (4 times/5 min) and incubated with chemiluminescence reagent (ECLTM Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and exposed to X-ray film. Levels of immunoreactivity were quantified densitometrically with the aid of an image analyzer (ImageJ). Densitometry analysis was corrected relative to the actin content (1:3,000, Chemicon, Millipore) used as loading control. Data represent means \pm SEM of 5-6 animals per each group.

Histology and quantification of lesion volume

Twenty-four hours after glutamate intrastriatal injection, mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 25 ml of 0.9% saline solution followed by 35 ml of 4% paraformaldehyde solution (in 0.1 mM phosphate buffer pH 7.3). Brains were removed and kept in the fixative solution at 4°C. Striatal coronal sections of 40 μ m were obtained in a vibratome (Leica VT 1000s)

for cresyl violet staining. The lesioned area (observed as a pale area containing pyknotic nuclei and loss of cell somata) was delineated manually in all brain sections and measured with the aid of an image analyzer (NIH Macintosh Image 1.6). Total lesion volume was obtained from the sum of all damaged areas multiplied by the width of the sections (40 μ m).

Statistical analysis

Data were analyzed through one-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc multiple comparison test to determine the difference between groups. Significant differences between data were considered when $p \leq 0.05$. Data from Western blots were analyzed considering the optical density values.

Results

At 10 weeks of age animals received a daily intraperitoneal injection of IOA (15 mg/kg) or vehicle for 3 days. Two hours after the last injection, GAPDH activity was evaluated in the striatum, cerebral cortex and hippocampus. According to the results, basal GAPDH activity was the same in wild-type and transgenic control animals in all the brain regions studied (Fig. 1). However, after IOA treatment GAPDH activity showed a larger decline in brains from transgenic mice as compared to wild-type (Fig. 1). In the striatum, GAPDH activity showed a 41.9 % and a 52.9% reduction in wild-type and R6/2 mice, respectively (Fig. 1A). In the cerebral cortex GAPDH activity was inhibited in 23.9% in wild-type animals and 67.9% in transgenic mice, while in the hippocampus a reduction of 33.1% in GAPDH activity was observed in wild-type animals and 63.6% in R6/2 mice (Fig. 1 B-C).

Then, we evaluated the changes in GLT-1 and GLAST glutamate transporter levels after IOA treatment. Two hours after

the treatment a reduction of 21.3% in GLT-1 protein content was observed in wild type mice and a 26.1% in R6/2 animals (Fig. 2A). In the case of GLAST, levels were reduced 37.3% in wild-type and 40.2% in transgenic mice (Fig. 2B). Similar changes were found in the cerebral cortex, GLT-1 protein content was decreased in 48.5% in wild-type and 31% in R6/2 animals (Fig. 3A), while GLAST levels were reduced in about 50% in both groups of animals (Fig. 3B).

Subsequently, we evaluated the vulnerability of the striatum to glutamate toxicity under conditions of glycolysis inhibition. Two hours after IOA or vehicle treatment, 500 nmol of glutamate was injected in the left striatum and the lesion volume was quantified twenty-four hours later. Glutamate-induced lesions in wild-type and transgenic animals were statistically larger than saline-induced lesions (Fig. 4), as previously reported [13]. In both cases, IOA treatment exacerbated glutamate toxicity since lesions observed in IOA-treated animals were larger than those observed in the saline-treated group; nonetheless this effect was similar in wild-type and R6/2 animals (Fig. 4B). Representative striatal coronal sections showing the lesioned area in transgenic and wild-type mice are depicted in figure 4A. The lesioned area is delineated by the dashed line.

Discussion

Failure in glutamate uptake during the progression of HD might be associated with excitotoxic damage to MSN in the striatum. Reduced glutamate transport has been observed in the frontal cortex of presymptomatic HD patients and at late stages of the disease, decreased levels of GLT-1 mRNA have been reported [6, 11]. In the R6/2 transgenic model, over-expression of GLT-1 delays the appearance of motor alterations and prolongs the lifespan of mice

[12]. These observations suggest that failure in glutamate transport is associated with the presence of motor abnormalities and the striatal neuronal loss observed at late stages of the disease, in this transgenic model. We have previously observed that, as a consequence of disease progression, GLT-1 and GLAST levels are decreased in R6/2 mice at 14 weeks of age. At this stage, glutamate injection exerts a toxic action leading to cell death and seizures, while in wild-type animals glutamate elicits moderate toxicity [13]. These results suggested a strong correlation between a progressive decline in glutamate uptake and excitotoxicity in HD. The lack of changes in the content of glutamate transporters and an equal vulnerability to glutamate toxicity in wild-type and R6/2 mice at earlier stages of the disease (10 weeks of age), supports this suggestion [13]. To further study the role of glutamate uptake and excitotoxic damage in HD, in the present study we aimed to induce a decrease in glutamate transporters, through the inhibition of the glycolytic pathway in R6/2 mice at 10 weeks of age. According to previous studies in the rat, sustained inhibition of GAPDH with IOA leads to a reduction in the content of GLT-1 transporter, decreased [³H]-D-aspartate uptake and a progressive increase in glutamate and aspartate extracellular levels [22]. In addition, IOA treatment enhances glutamate toxicity in the rat striatum and hippocampus [23, 24].

In agreement with our previous observations, the present results suggest that down regulation of glutamate transporters in R6/2 mice, enhances the vulnerability of the striatum to excitotoxic damage. According to the results, IOA exerted a larger inhibition of GAPDH activity in transgenic (59.2%) relative to wild-type animals (41.9%) in the striatum. However, IOA treatment resulted in a similar reduction of GLT-1 (21-26%) and GLAST (37-40%) levels in wild-type

and R6/2 mice, and exacerbated glutamate neurotoxicity to the same extent in both groups of animals. These observations suggest that at 10 weeks of age, transgenic animals show the same vulnerability to excitotoxic damage than wild-type littermates, and that the sensitivity of the glutamate transport system to the failure of the glycolytic pathway is the same in both groups of mice. Results also suggest that metabolic failure can precipitate excitotoxic damage in R6/2 animals. It is unknown whether the changes observed in glutamate transporters in R6/2 mice at 14 weeks of age, are the consequence of a progressive decline in energy metabolism, but defects in the glycolytic pathway have been described in HD patients, even at early stages [28]. On the other hand, *in vitro* studies have shown that mhtt is able to bind to GAPDH, and GAPDH aggregates have been observed in the brain of the R6/2 mouse both in the cytoplasm and the nucleus [30, 31, 34]. However, in postmortem tissue from HD patients Kish et al. reported only a discrete but significant reduction in GAPDH activity, while Browne et al. found no changes [35, 36]. Another study reported no changes in enzyme activity during resting conditions in fibroblasts from HD patients, but under energy demanding conditions a lower activation of GAPDH was observed, as compared to that shown by fibroblasts from control individuals [37]. The present study shows no changes in basal GAPDH activity, but IOA treatment induced a larger inhibition of the enzyme in transgenic mice, particularly, in the cerebral cortex and the hippocampus. However, similar reductions in glutamate transporter levels were found after IOA treatment in transgenic and wild type animals, even in the cerebral cortex, suggesting that partial inhibition of GAPDH activity is sufficient to down regulate glutamate transporters and exacerbate glutamate toxicity.

Previous studies have shown that at 10 weeks of age R6/2 mice are not vulnerable to excitotoxic damage, and are even resistant to quinolinic and kainic acid neurotoxicity [38, 39]. In contrast, in the present study we show that mice are vulnerable to glutamate neurotoxicity both in normal conditions and under metabolic challenge. Since glutamate instead of kainate or quinolinic acid was used in the present study, results suggest an important role of AMPA receptors stimulation in glutamate neurotoxicity in R6/2 mice. In fact, a relationship between the onset of the disease and the editing of AMPA receptors subunits in HD patients has been described [40].

Altogether, the present data support the role of glutamate transporters on the development of excitotoxic damage in HD, and indicate that this mechanism of neuronal death can be precipitated under metabolic stress. To our knowledge, this is the first report in a HD rodent model, showing that impaired energy metabolism can cause the alteration of glutamate neurotransmission rendering neurons more vulnerable to excitotoxicity. In addition to glutamate uptake failure, some other alterations such as increased oxidative damage, failure in calcium buffering and aggregation of mhtt, might converge and render MSN neurons more vulnerable to glutamate-mediated damage at late stages of the disease.

Acknowledgement

The authors thank Mr. Héctor Malagón for his help in the care and handling of transgenic mice at the animal house. This work was supported by PAPITT (UNAM) IN213507 grant to LM and CONACyT 194940 fellowship to AM Estrada-Sánchez.

References

1. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is

expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971-983.

2. Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227:770-773.

3. Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ et al (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.

4. McGeer EG, McGeer PL (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263:517-519.

5. Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-318.

6. Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S et al (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT-1) mRNA expression in Huntington's disease-an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:440-454.

7. Nicniocaill B, Haraldsson B, Hansson O et al (2001) Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice. *Eur J Neurosci* 13:206-210.

8. Liévens JC, Woodman B, Mahal A et al (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 8:807-821.

9. Behrens PF, Franz P, Woodman B et al (2002) Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* 125:1908-1922.

10. Shin JY, Fang ZH, Yu ZX et al (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 171:1001-1012.

11. Hassel B, Tessler S, Faull RL et al (2008) Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochem Res* 33:232-237.
12. Miller BR, Dorner JL, Shou M et al (2008) Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse. *Neuroscience* 153:329-337.
13. Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J et al (2009) Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurobiol Dis* 34:78-86.
14. Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133-1145.
15. Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10625-10629.
16. Swanson RA, Chen J, Graham SH (1994) Glucose can fuel glutamate uptake in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:1-6.
17. Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337-7342.
18. Debernardi R, Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Trans-inhibition of glutamate transport prevents excitatory amino acid-induced glycolysis in astrocytes. *Brain Res* 850:39-46.
19. Cholet N, Pellerin L, Welker E et al (2001) Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:404-412.
20. Gemba T, Oshima T, Ninomiya M (1994) Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 63:789-795.
21. Ogata T, Nakamura Y, Tsuji K et al (1995) A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 20:737-743.
22. Camacho A, Montiel T, Massieu L (2007) Sustained metabolic inhibition induces an increase in the content and phosphorylation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors and a decrease in glutamate transport in the rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 30:873-886.
23. Massieu L, Gómez-Román N, Montiel T (2000) In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 165:257-267.
24. Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L (2006) D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition in vivo. *Neurochem Res* 31:1399-1408.
25. Matthews RT, Ferrante RJ, Jenkins BG et al (1997) Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J Neurochem* 69:285-289.
26. Sandberg M, Nyström B, Hamberger A (1985) Metabolically derived aspartate-elevated extracellular levels in vivo in iodoacetate poisoning. *J Neurosci Res* 13:489-495.
27. Camacho A, Montiel T, Massieu L (2006) The anion channel blocker, 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonic acid prevents neuronal death and excitatory amino acid release during glycolysis inhibition in the

hippocampus in vivo. *Neuroscience* 142:1005-1017.

28. Powers WJ, Videen TO, Markham J et al (2007) Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2945-2949.

29. Jenkins BG, Rosas HD, Chen YC (1998) ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 50:1357-1365.

30. Burke JR, Enghild JJ, Martin ME et al (1996) Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 2:347-350.

31. Bae BI, Hara MR, Cascio MB et al (2006) Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3405-3409.

32. Paxinos G, Franklin KJ (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press, San Diego California, USA.

33. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

34. Senatorov VV, Charles V, Reddy PH et al (2003) Overexpression and nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a transgenic mouse model

of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 22:285-297.

35. Kish SJ, Lopes-Cendes I, Guttman M et al (1998) Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. *Arch Neurol* 55:1299-1304.

36. Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U et al (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646-653.

37. Cooper AJ, Sheu KF, Burke JR et al (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase abnormality in metabolically stressed Huntington disease fibroblasts. *Dev Neurosci* 20:462-468.

38. Morton AJ, Leavens W (2000) Mice transgenic for the human Huntington's disease mutation have reduced sensitivity to kainic acid toxicity. *Brain Res Bull* 52:51-59.

39. MacGibbon GA, Hamilton LC, Crocker SF et al (2002) Immediate-early gene response to methamphetamine, haloperidol, and quinolinic acid is not impaired in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci Res* 67:372-378.

40. Akbarian S, Smith MA, Jones EG (1995) Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res* 699:297-304.