



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTOS DE LA MODULACIÓN
FARMACOLÓGICA DE LA VÍA DE LA KINURENINA
SOBRE LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES,
BIOQUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS GENERADAS
POR EL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE EN RATAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

PAUL CARRILLO MORA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL

COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno CARRILLO MORA PAUL con número de cuenta 91309244 con la tesis titulada: "EFECTOS DE LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA DE LA KINURENINA SOBRE LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES, BIOQUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS GENERADAS POR EL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE EN RATAS.", realizada bajo la dirección del: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL

Presidente:	DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal:	DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal:	DRA. GINA LORENA QUIARTE
Vocal:	DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
Secretario:	DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL
Suplente:	DRA. LAURA COLÍN BARENQUE
Suplente:	DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 03 de febrero de 2011

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM que me dio la oportunidad de alcanzar e incluso superar mis expectativas y metas académicas.
- A la UNAM en general que para mi continua siendo mi casa, y a la cual estoy profundamente orgulloso de pertenecer.
- Mi agradecimiento eterno a mi tutor principal el Dr. Abel Santamaría por todas sus enseñanzas, por permitirme formar parte de su laboratorio y apoyar e impulsar en todo momento mi crecimiento profesional y académico.
- A los miembros del Comité Tutor: la Dra. Teresa I. Fortoul Van Der Goes y la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por compartirme su experiencia y por su continuo apoyo e invaluable orientación para el desarrollo de mi proyecto investigación.
- A los miembros del jurado de mi examen de titulación: Dra. Laura Colín Barenque, Dra. Gina Lorena Quirarte, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Mauricio Díaz Muñoz por sus importantes comentarios que permitieron enriquecer mi trabajo de tesis.
- A todos mis compañeros del laboratorio que me ayudaron y me apoyaron en todo momento, muchas gracias.
- Agradezco especialmente a toda la gente que me apoyó desinteresadamente y con gran disposición para la realización de mi proyecto de investigación: A la Dra. Laura Colín Barenque por su valiosísima orientación en el análisis morfológico de mi proyecto; a Armando Zepeda Rodríguez y Francisco Pasos Nájera por su apoyo en la obtención de las imágenes histológicas; al laboratorio de técnica histológica de la Facultad de Medicina de la UNAM en especial a Verónica Rodríguez Mata y Judith Reyes Ruiz por todo su apoyo y asesoría técnica; y en general a todo el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM en donde recibí todo el tiempo apoyo, orientación y facilidades para trabajar muy a gusto.

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a Adriana mi esposa, que me apoya y me impulsa todo el tiempo a perseguir y conseguir mis sueños; todo su cariño, comprensión y apoyo fueron vitales para lograr terminar este trabajo de doctorado, muchas gracias amor.

A mis hijas Marifer y Sofía que son mis grandes amores y orgullos, y me dejan aprender de ellas todos los días, gracias por su comprensión y paciencia.

A mi mamá y mi hermano que han estado conmigo en todo momento. El camino que ahora continuo sin lugar a dudas tuvo su origen en ustedes, muchas gracias.

INDICE

I. INDICE.....	4
II. LISTA DE FIGURAS Y GRAFICOS.....	6
III. ABREVIATURAS.....	7
IV. RESUMEN.....	8
VI. ABSTRACT.....	9
VI. INTRODUCCIÓN	
1. BIOLOGÍA DE LAS KINURENINAS EN MAMIFEROS.....	10
1.1 Breve reseña histórica.....	10
1.2 Kinureninas en el sistema nervioso central.....	13
1.3 El ácido kinurénico.....	17
1.4 Manipulación farmacológica de la vía de kinurenina.....	19
2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	21
2.1 Generalidades.....	21
2.2 Hipótesis amiloidea de la enfermedad de Alzheimer.....	24
2.3 Receptores glutamatérgicos.....	27
2.4 Disfunción sináptica en la Enfermedad de Alzheimer: Rol del A β y los receptores NMDA.....	29
2.4 Kinureninas y Alzheimer.....	35
2.5 Modelos experimentales de la Enfermedad de Alzheimer.....	37
3. ANTAGONISTAS NMDA: EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA Y EL PROCESO APRENDIZAJE-MEMORIA.....	41
VII. JUSTIFICACIÓN.....	43
VIII. OBJETIVOS.....	44
IX. HIPÓTESIS.....	45

X. METODOLOGÍA.....	46
1. Reactivos.....	46
2. Animales de experimentación.....	46
3. Grupos experimentales y cirugía estereotáxica.....	47
4. Evaluación conductual.....	48
a) Evaluación de la conducta motora espontánea en campo abierto.....	48
b) Evaluación de la memoria espacial de largo plazo.....	50
5. Procesamiento y análisis histológico e inmunohistoquímico.....	53
6. Análisis estadístico.....	54
XI. RESULTADOS.....	55
1. Evaluación de la conducta motora espontánea.....	55
2. Evaluación de la memoria espacial de largo plazo.....	57
3. Evaluación morfológica del sector CA1 del hipocampo.....	59
4. Evaluación inmunohistoquímica contra GFAP.....	65
XII. DISCUSION.....	68
Parámetros conductuales.....	71
Conducta motora espontánea.....	71
Memoria espacial de largo plazo.....	74
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos.....	77
XIII. CONCLUSIONES.....	79
XIV. PERSPECTIVAS.....	80
XV. BIBLIOGRAFÍA.....	82
XVI. SOBRETIROS DE ARTICULOS PUBLICADOS.....	112

LISTA DE FIGURAS Y GRAFICOS

Figura o Gráfico	Pagina
Figura 1. Vía de la kinurenina	16
Figura 2. Topología del receptor NMDA	19
Figura 3. Cambios anatomopatológicos en la enfermedad de Alzheimer	24
Figura 4. Vía proteolítica amiloidogénica.	25
Figura 5. Familia de receptores glutamatérgicos	29
Figura 6. Interacciones A β y receptores NMDA	34
Figura 7. Monitor de actividad espontanea en campo abierto	49
Figura 8. Laberinto acuático de Morris	51
Figura 9. Efecto de la administración aguda de PROB, L-KYN, PROB+ L-KYN y MK-801 sobre la actividad motora.	56
Figura 10. Efecto subcrónico de la administración de PROB, L-KYN, PROB+ L-KYN y MK-801 sobre la actividad motora.	56
Figura 11. Primera evaluación de la memoria espacial (48 horas)	57
Figura 12. Efecto del PROB, L-KYN, PROB+ L-KYN y MK-801 sobre el déficit de memoria espacial inducido por A β	59
Figura 13. Microfotografía de bajo aumento del hipocampo y acercamiento del sector CA1	60
Figura 14. Cortes histológicos representativos de todos los grupos teñidos con Kluver-Barrera	62
Figura 15. Análisis morfológico cuantitativo del sector CA1	64
Figura 16. Cortes representativos de todos los grupos con inmunohistoquímica contra GFAP	66
Figura 17. Análisis cuantitativo de las células reactivas a GFAP	67
Tablas	
Tabla 1. Comparativo de los efectos biológicos del A β 1-42 vs. A β 25-35	39

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2AAF	2-acetilaminofluoreno
3HAA	Acido 3-hidroxiantranilico
3-HK	3-Hidroxikinurenina.
AA	Acido antranilico
AC	Adenilato ciclasa
AMPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolpropionico
APOE4	Alelo ϵ -4 de la Apolipoproteina 4
A β	Amiloide beta
BHE	Barrera hemato-encefalica.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
FLC	Fosfolipasa C
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HCL	Ácido clorhídrico
I.H.B.	Intrahipocampal Bilateral.
I.P.	Administración intraperitoneal
IDO	Indolamina dioxigenasa
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
KATs	Kinurenina aminotransferasas
KYNA	Ácido kinurénico
KYNs	Kinureninas
L-KYN	L-kinurenina
MK-801	Dizocilpina
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADP+	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
NICALA	Nicotinilalanina
NMDA	N-metil-D-Aspartato.
NMDAr	Receptor NMDA
PLP	Potenciación a largo plazo
PPA	Proteína precursora de amiloide
PROB	Probenecid
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
QUIN	Ácido Quinolínico
S.C.	Administración subcutanea
SNC	Sistema nervioso central
TNF alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
VK	Vía de la kinurenina

RESUMEN:

Uno de los procesos fisiopatológicos implicados en el origen de la enfermedad de Alzheimer es la acumulación del péptido amiloide beta ($A\beta$) en el tejido cerebral. El $A\beta$ es un péptido de 39-42 aminoácidos que experimentalmente ha demostrado poseer diversas propiedades tóxicas. Una de ellas es la excitotoxicidad ya que el $A\beta$ es capaz de incrementar la actividad de los receptores NMDA (NMDAr). Se ha demostrado que el ácido kinurénico (KYNA), un metabolito endógeno del triptofano (vía de la kinurenina= VK), es un antagonista eficaz del sitio co-agonista de glicina del NMDAr. En varios estudios se ha demostrado que la administración sistémica de Probenecid (PROB), que inhibe la eliminación del KYNA del tejido nervioso, y de L-kinurenina (L-KYN), precursor metabólico que atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica (BHE) incrementa de forma significativa los niveles cerebrales de KYNA, lo cual se ha relacionado con efectos neuroprotectores en distintos modelos de toxicidad. El objetivo del presente trabajo fue demostrar los efectos neuroprotectores a nivel conductual y morfológico, de la administración sistémica de PROB y/o L-KYN en un modelo de toxicidad por $A\beta$ hipocampal comparándolos con los efectos de otro antagonista NMDA: el MK-801. Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 250-280 g de peso y se formaron 9 grupos experimentales (n=7-8): 1) Control: Solución salina intra-hipocampal bilateral (IHB) e intraperitoneal (IP); 2) $A\beta$ IHB + Solución salina IP; 3) $A\beta$ IHB + PROB IP; 4) $A\beta$ IHB + L-KYN IP; 5) $A\beta$ IHB + PROB + L-KYN IP; 6) $A\beta$ IHB + MK-801 IP; 7) MK-801 IP; 8) PROB IP; y 9) L-KYN IP. Las dosis utilizadas de los fármacos fueron las siguientes: PROB 50 mg/Kg/día, L-KYN 75 mg/Kg/día, MK-801 0.8 mg/Kg/día, todos administrados durante 7 días. El $A\beta$ 25-35 soluble (1 μ L 100 μ M) se administró por vía estereotáxica en el sector CA1 de ambos hipocampos. La evaluación conductual consistió en: 1) Análisis de la actividad motora espontánea en dos ocasiones (30 minutos después de la primera administración de los tratamientos y 30 min antes de la primera evaluación de memoria espacial); 2) Evaluación de la memoria espacial de largo plazo cada semana después de la administración de $A\beta$, durante 4 semanas. La evaluación histológica se realizó al final de la evaluación conductual y consistió en el análisis cualitativo y cuantitativo del sector CA1 en cortes teñidos con Kluver-Barrera así como inmunohistoquímica contra GFAP. Los resultados no mostraron efectos significativos de la administración de PROB y/o L-KYN sobre la actividad motora. Con respecto a la evaluación de la memoria espacial, todos los grupos con tratamiento mostraron protección del deterioro inducido por $A\beta$ a partir de la 3-4 semana. El análisis morfológico mostró que el grupo de $A\beta$ tuvo una disminución estadísticamente significativa del número de neuronas viables así como un incremento en el número de neuronas degeneradas. En todos los grupos con tratamiento se observó preservación neuronal siendo este efecto mas evidente en el grupo de $A\beta$ + PROB. Al obtener el índice de neuronas degeneradas/totales, se observó que todos los grupos en los que se administró $A\beta$ presentaron un incremento del porcentaje de células degeneradas respecto de las totales contenidas en el área estudiada (300 μ m). El análisis cuantitativo de células reactivas el GFAP demostró un incremento significativo de los astrocitos en el hipocampo en el grupo de $A\beta$, y una reducción significativa de la astrocitosis reactiva en los grupos de tratamiento. Concluimos que la administración sistémica de L-KYN y PROB no tiene efectos motores significativos y tiene efectos neuroprotectores importantes sobre la memoria espacial de largo plazo y sobre las neuronas del estrato piramidal de CA1 en el modelo de toxicidad por $A\beta$ 25-35 soluble.

ABSTRACT

One of the most important pathological processes involved in the origin of Alzheimer's disease is the overproduction and accumulation of beta-amyloid peptide (A β) in brain tissues. The A β is a 39-42 amino acids peptide that experimentally has demonstrated different toxic properties, one of the most important is excitotoxicity as the A β is able to increase the activity of NMDA receptors (NMDAr). Kynurenic acid (KYNA) is an endogenous metabolite of tryptophan (Kynurenine pathway = KP) that has proven to be an effective antagonist of the glycine-B site of the NMDAr. Several studies have shown that systemic administration of probenecid (PROB), which inhibits the removal of KYNA from nerve tissue, and L-kynurenine (L-KYN), a metabolic precursor that easily crosses the blood-brain barrier (BBB), produces significant increase brain levels of KYNA which has been associated with neuroprotective effects in various models of toxicity. The aim of this study was to demonstrate the neuroprotective effects at the behavioral and morphological levels of systemic administration of PROB and / or L-KYN in a model of hippocampal A β toxicity compared with the effects of another NMDA antagonist, the MK-801. We used male Wistar rats between 250-280 g in weight and formed into 9 experimental groups with 7-8 animals each: 1) Control: saline bilateral intra-hippocampal (IHB) and intraperitoneal (IP) 2) A β IHB IP saline, 3) A β IHB PROB IP, 4) A β IP IHB L-KYN, 5) A β IHB L-KYN PROB IP, 6) MK-801 IHB A β IP, 7) MK-801 IP, 8) PROB IP, and 9) L-KYN IP. Doses of drugs were: PROB 50 mg/Kg/d, L-KYN 75 mg/Kg/d, MK-801 0.8 mg/Kg/d, all given for 7 days. The soluble A β 25-35 (1 μ L 100 μ M) was administered via stereotactic surgery in CA1 sector of both hippocampi. The behavioral assessment consisted of: 1) Analysis of spontaneous motor activity twice (30 min after the first administration of treatment and 30 min before the first assessment of spatial memory), 2) Evaluation of long-term spatial memory every week after A β administration for 4 weeks. Histological evaluation was performed at the end of behavioral evaluation and consisted of qualitative and quantitative analysis of CA1 in sections stained with Kluver-Barrera and immunohistochemistry against GFAP. In this study we found no significant effects of the administration of PROB and/or L-KYN on motor activity. Spatial memory in all treatment groups showed protection from A β -induced impairment after a 3-4 week. In the morphological analysis in the A β group showed a significant decrease in the number of viable neurons and an increase in the number of neurons degenerate. In all treatment groups were observed neuronal preservation and this effect was most evident in the group of A β PROB. To get the index of degenerated neurons / total, we observed that all groups who were administered A β show an increase of percentage of degenerating cells on the total contained in the study area (300 μ m). The quantitative analysis of the reactive cells GFAP, showed a significant increase of astrocytes in the hippocampal CA1 sector in the A β group, and a significant reduction of reactive astrocytosis in the treatment groups. Because of this, we can conclude that systemic administration of L-KYN and PROB has no significant motor effects but has significant neuroprotective effects on long-term spatial memory and in neurons of the CA1 pyramidal layer in the model A β 25-35 soluble toxicity.

INTRODUCCION

1. BIOLOGÍA DE LAS KINURENINAS EN MAMÍFEROS

1.1 Breve reseña histórica.

El descubrimiento de la vía de kinurenina así como de las acciones biológicas de sus distintos metabolitos se desarrolló de forma paralela con el estudio del metabolismo del triptofano (Knox, 1953). Históricamente desde 1904 se había detectado por primera vez la presencia de ácido kinurénico (KYNA) en la orina de perros (Ellinger, 1904), sin embargo, no fue sino hasta 1947 que la vía de la kinurenina (VK) fue reconocida como la vía principal de síntesis de nicotinamida y sus conjugados nucleótidos a partir del triptofano (Beadle et al., 1947). Por esas fechas la VK solo se estimaba importante por su papel en la síntesis del co-factor NAD^+ , así como en la deficiencia de piridoxina (vitamina B6), estado en el cual se altera la síntesis de la nicotinamida (Stone, 1993). El descubrimiento posterior de la 5-hidroxitriptamina (serotonina) como neurotransmisor neuronal desvió el interés del estudio del metabolismo del triptofano centrándose en la vía de síntesis de serotonina, a pesar de que, como se demostró posteriormente, solo entre el 1-5% del triptofano que se ingiere se convierte en serotonina (Peters, 1991). La observación experimental de que ratas alimentadas con una dieta rica en triptofano y el compuesto 2-acetilaminofluoreno (2AAF) desarrollaban cáncer vesical, mientras que las que solo eran alimentadas con dicho compuesto no lo desarrollaban, llevó a sugerir que aminas aromáticas como los o-aminofenoles y kinureninas (KYNs), derivados del metabolismo del triptofano y que son excretadas en la orina podían tener un papel en la génesis de cáncer vesical en los seres humanos (Boyland & Williams, 1956). Con anterioridad ya se había demostrado experimentalmente el desarrollo de cáncer

vesical en ratones en los que se administraba el metabolito 3-hydroxikinurenina (3-HK) por vía intravesical (Boyland & Williams, 1956). Dicha hipótesis impulsó el desarrollo de innovadores métodos de detección e identificación de dichos metabolitos presentes en la orina (de ello derivó el nombre de *ureninas=orina*) en muy distintas especies (Brown & Price, 1956). Sin embargo, hasta ese momento no se conocían las propiedades neurotrópicas de algunas KYNs. La observación experimental de que ratas y ratones a los que se había administrado metabolitos del triptofano (kinureninas), ya sea por vía subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.), presentaban una disminución en la conducta de exploración, llevó por primera vez a investigar los efectos de la administración intracerebral de distintas KYNs y otros metabolitos del triptofano (Lapin, 1978a). En el estudio pionero llevado a cabo por Lapin (1978a), la administración intraventricular de 6 distintas KYNs indujo un incremento significativo de la actividad motora en ratones; e incluso se presentaron crisis convulsivas con la administración de algunos de estos metabolitos; el más poderoso en la inducción de estos efectos fue el ácido quinolínico (QUIN), que además fue el único capaz de generar los mismos efectos conductuales cuando se administró por vía i.p., a dosis muy altas (Lapin, 1978a). Esta evidencia por supuesto llevó a proponer que de existir síntesis intracerebral de KYNs, estas podrían jugar un papel en el origen de los trastornos convulsivos, además de sugerir que la penetración de las KYNs a través de la barrera hemato-encefálica (BHE) resultaba muy pobre (Lapin, 1978a). Estudios posteriores en otras especies corroboraron estos primeros hallazgos, comprobando inicialmente el papel estimulante de algunas KYNs, en especial del QUIN, sobre la función neuronal (Lapin, 1978b; 1979; 1981a; 1981b). Más tarde se comprobó por medio de estudios de electrofisiología llevados a cabo por Stone & Perkins (1981) que el QUIN era un potente activador de receptores

para aminoácidos excitadores y por primera vez, aunque de forma inesperada, se demostraron las propiedades antagónicas del ácido kinurénico (KYNA) en la excitabilidad neuronal (Stone & Perkins, 1981; Perkins & Stone, 1982). Después en otros estudios se demostró por un lado, que la administración intracerebral de QUIN producía lesiones tisulares típicamente excitotóxicas (Schwarcz et al., 1983; Schwarcz & Kohler, 1983), que incluso podían ser prevenidas por la administración del KYNA (Foster et al., 1984); pero además, como ya se sospechaba, se demostró la síntesis intracerebral de KYNs, al identificar QUIN en tejido nervioso humano y de roedores (Wolfensberger et al., 1983). Estas evidencias experimentales iniciales fueron el detonante para una gran cantidad de estudios posteriores que surgieron encaminados a dilucidar distintos aspectos relacionados con los efectos neurobiológicos de las KYNs, el mecanismo molecular de acción, su metabolismo y síntesis, así como su participación en los mecanismos fisiopatológicos de muy diversos trastornos tanto neurológicos como psiquiátricos, y más recientemente incluso estudios a cerca de su modulación con fines terapéuticos (Santamaría & Rios, 1993; Guillemin & Brew, 2002; Nemeth et al., 2006; Vamos et al., 2009). A pesar de que en un inicio las KYNs cobraron importancia por sus implicación en patologías no neurológicas, la mayor parte de la literatura actual está dedicada al estudio de los efectos en el sistema nervioso central o periférico (Nemeth et al., 2005). Sin embargo, aunque en menor cantidad, existe amplia evidencia de que se encuentran involucradas en distintos trastornos y enfermedades sistémicas como las metabólicas, en especial la diabetes (Kotake et al., 1975), inmuno-hematológicas (Romani et al., 2008; Zdzisinska et al., 2010), renales (Saito et al., 2000; Pawlak et al., 2009a), cardiovasculares (Urbanska et al., 2006; Pawlak et al., 2009b), oftalmológicas (Zarnowski et al., 2007), e incluso en el cáncer (Constantino, 2009;

Suzuki et al., 2010). Por otra parte aunque suele hablarse de las KYNs como presentes solo en organismos biológicos pertenecientes al reino animal, incluyendo artrópodos vectores de enfermedades humanas (Bhattacharyya et al., 2001; Han et al., 2007), también se ha descrito la presencia de algunas KYNs en organismos vegetales e incluso en frutos y tubérculos de consumo humano cotidiano, así como en productos de origen animal como la miel de abeja, en donde se han determinado niveles elevados de KYNA. Los efectos del consumo de estas KYNs en la dieta humana, aún no se conocen por completo, pero se ha establecido que la ingestión oral de éstas KYNs se acompaña de una adecuada absorción intestinal. Por lo que se requiere estudios posteriores para investigar los efectos que pudieran tener estas KYNs a nivel sistémico (Turski et al., 2009).

1.2 Kinureninas en el sistema nervioso central.

Recientemente, ha cobrado relevancia el estudio de la participación de los metabolitos neuroactivos del triptofano en la patogenia de distintas enfermedades del sistema nervioso, tanto degenerativas como infecciosas y no infecciosas (Pérez-De la Cruz et al., 2007). Esta vía metabólica resulta muy importante por el hecho de que produce al menos dos metabolitos neuroactivos y con efectos completamente antagónicos, los cuales derivan directa o indirectamente de la L-kinurenina (L-KYN), que es el producto primario más importante de la degradación del triptófano (Lapin, 1978a; 1978b; Schwarcz & Pellicciari, 2002). En mamíferos, la vía de kinurenina (VK) es la principal vía catabólica del triptofano no proteico, se estima que más del 80% del triptofano es metabolizado por esta vía (Figura 1). La vía comienza con la apertura del anillo indólico del triptofano y termina con la síntesis del cofactor enzimático de presentación celular ubicua: el NAD⁺ o el NADP⁺. Uno de los

metabolitos de esta vía, el KYNA, se forma en una derivación sin salida de la VK a través de una reacción de transaminación irreversible llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas kinurenina amino transferasas (KAT's); en el organismo de los mamíferos existen por lo menos tres isoformas de las KAT's: I, II y III (Schwarcz & Pellicciari, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que la KAT II es la principal responsable de la síntesis del KYNA en el SNC de los mamíferos debido a que su pH óptimo de funcionamiento es muy cercano al fisiológico y a su mayor afinidad por el sustrato (Vamos et al., 2009). La producción del KYNA está determinada por un delicado balance entre varios factores: 1) La competencia de la VK con otras vías metabólicas, como la síntesis de proteínas o de neurotransmisores indolamínicos (como la serotonina y la melatonina); 2) La disponibilidad del metabolito inicial de la VK, es decir la L-KYN; y 3) La captura celular diferencial de la L-KYN por diversos tipos celulares en el SNC (astrocitos, microglia, neuronas, etc.) (Rossi et al., 2008).

El otro metabolito neuroactivo derivado de la VK es el QUIN, el cual es sintetizado a partir de la L-KYN en su ruta hacia el NAD^+ . Se ha comprobado que el QUIN es un potente neurotóxico y en dicho efecto están involucrados una combinación de factores como son la ausencia de mecanismos eficaces de remoción extracelular (recaptura, difusión, digestión enzimática), su habilidad de generar radicales libres (Ríos & Santamaría, 1991), y a la activación específica de los subtipos NR2A y NR2B de los NMDAr, generando excitotoxicidad (Schwarcz, 1983; Santamaría & Jiménez, 2005). El QUIN se ha relacionado con el daño tisular encontrado en múltiples patologías, tanto sistémicas como en el SNC. En el sistema nervioso se han observado niveles elevados de QUIN en tejido y líquido cefalorraquídeo en patologías infecciosas como la meningitis y la encefalitis bacterianas, virales, parasitarias y fúngicas (Heyes et al., 1992). Desde hace más de 20 años se observó

que existen niveles incrementados de QUIN y 3-hidroxicinurenina (3-HK) en la corteza frontal y temporal de pacientes con enfermedad de Huntington (EH), así como una disminución de los niveles de KYNA en el núcleo caudado; ambos fenómenos presentes en las primeras etapas de la enfermedad (Guidetti et al., 2000; Guidetti et al., 2004; Guidetti et al., 2006). Las evidencias experimentales actuales sugieren que dichas alteraciones del metabolismo de la VK pueden ser un evento temprano durante el desarrollo de la EH, y que éste puede ser el fenómeno bioquímico que ligue la sobre-producción de huntingtina mutada con el daño neuronal progresivo por excitotoxicidad que caracteriza a la enfermedad (Pérez De La Cruz & Santamaría, 2007; Schwarcz et al., 2010). La participación de los metabolitos de la vía de la kinurenina se ha estudiado en muchas otras patologías neurológicas como la epilepsia, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, el complejo demencia-SIDA, la esquizofrenia, etc. (para una revisión más extensa del tema véase Stone, 2001; Pérez-De La Cruz et al., 2007).

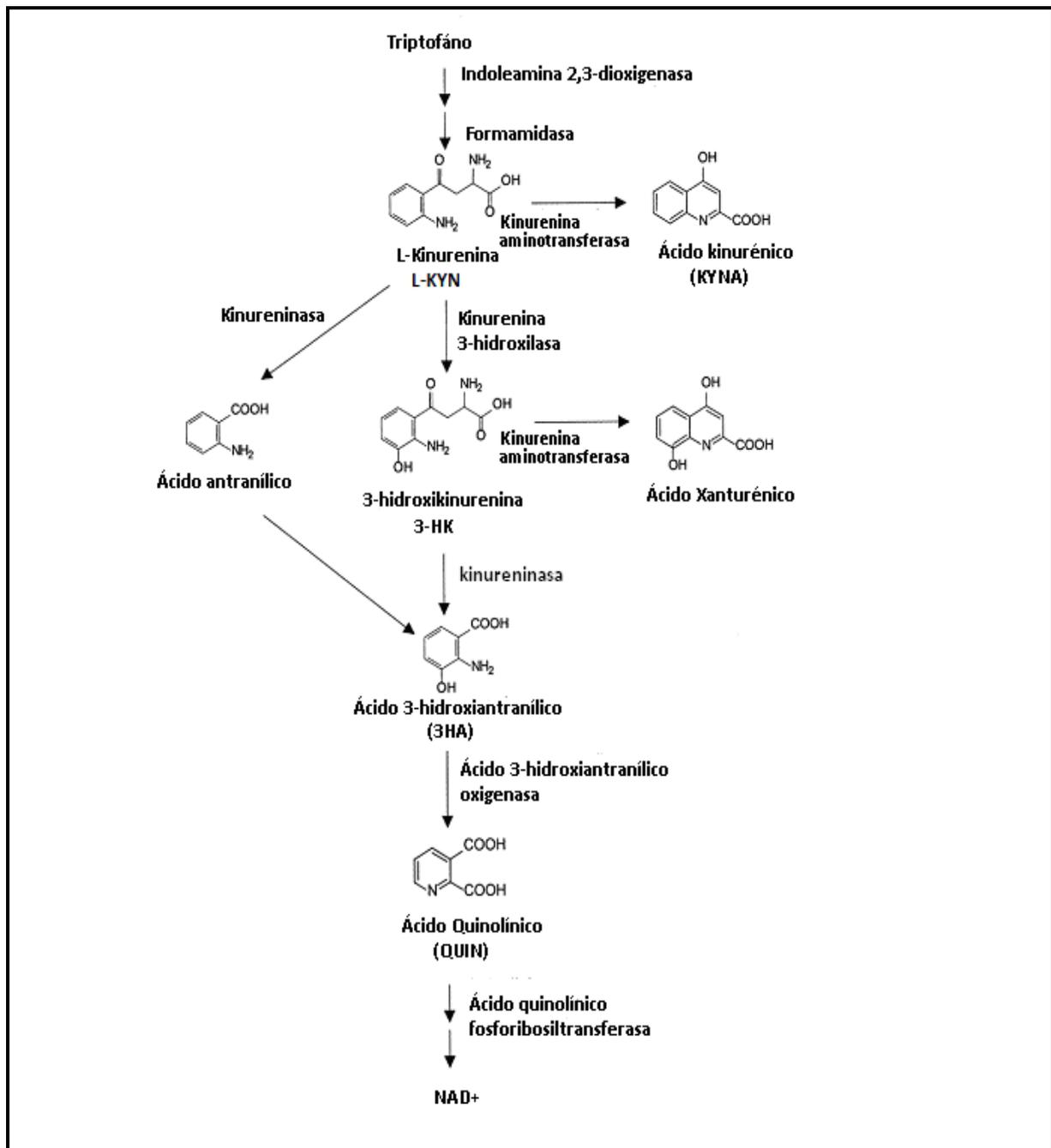


Figura 1. Esquema resumido de la vía de la kinurenina en mamíferos en donde se presentan los compuestos y enzimas más importantes (Basado en Schwarcz & Pellicciari, 2002)

La localización celular de la VK solo se conoce parcialmente. Todo el sistema enzimático de esta vía se encuentra completo en células de la línea monocítica como son los macrófagos y la microglia (Guillemin et al., 2003). De hecho, se considera que dentro del sistema nervioso, la mayor parte de la producción de QUIN

tiene su origen en las células microgliales tisulares y los macrófagos que ingresan desde la circulación periférica, debido a que estas células tienen en general una baja actividad de enzimas KAT's que son las responsables de la síntesis de otros metabolitos como el KYNA (Schwarcz & Pellicciari, 2002). La vía se encuentra incompleta en astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales (Heyes et al., 1992; Heyes et al., 1997) ya que los astrocitos expresan todas las enzimas de la VK a excepción de la kynurenina 3-hidroxilasa, por lo que los astrocitos solo son capaces de producir los metabolitos iniciales de la VK y KYNA en grandes cantidades, sugiriendo así que estas células son importantes en la protección neuronal en contra de procesos de excitotoxicidad (Ting et al., 2007). En las neuronas solo existen reportes anecdóticos de la presencia de KAT's, kinurenina 3-hidroxilasa o de QUIN-fosforribosiltraferasa, pero la mayoría de los estudios sugiere que las neuronas suelen ser las receptoras de los efectos de los metabolitos neuroactivos de la VK más que estar involucradas en su producción (Schwarcz & Pellicciari, 2002).

1. 3 Ácido kinurénico

El KYNA es una de las KYNs de las que más recientemente se comprobó su presencia en tejido nervioso (Carla et al., 1988; Moroni et al., 1988). Se estima que el contenido total de KYNA en cerebro de rata es de aproximadamente 24 pmol/g, observando variaciones regionales de concentración dentro del SNC: las concentraciones menores en el cerebelo (15 pmol/g) y las más altas en el tallo cerebral (29 pmol/g) (Moroni et al., 1988). En seres humanos en el estudio llevado a cabo por Turski y cols. (1988) en el tejido nervioso obtenido de autopsias de pacientes entre 50-71 años se demostró que las concentraciones más elevadas de

KYNA se encontraron en el núcleo caudado (1.58 pmol/mg) mientras que las más bajas se observaron en el cerebelo (0.14 pmol/mg) (Turski et al., 1988).

El KYNA es el único inhibidor conocido de receptores de aminoácidos excitadores de origen endógeno, con un amplio espectro de acción. En concentraciones muy elevadas, el KYNA tiene propiedades anticonvulsivas y neuroprotectoras (Foster et al., 1984; Lekieffre et al., 1990). En concentraciones de 8-20 μM , el KYNA actúa como un bloqueador competitivo del sitio co-agonista de glicina en el NMDAr, y en concentraciones superiores de entre 50-500 μM puede incluso bloquear el sitio agonista del glutamato (Kessler et al., 1989; Stone, 1993). En concentraciones en rangos nanomolares a micromolares bajas ($\sim 7 \mu\text{M}$) funciona además como un inhibidor no competitivo del receptor α -7 nicotínico de acetilcolina (Hilmas et al., 2001; Schwarcz & Pellicciari, 2002) (Figura 2). El hecho de que las concentraciones necesarias de KYNA para su acción en receptores sean muy cercanas a las fisiológicas (15-150 pmol/g), sugiere un papel importante en la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica normal (Hilmas et al., 2001). El KYNA, por su naturaleza polar, atraviesa pobremente la barrera hematoencefálica, por lo que la mayor parte de KYNA disponible en el SNC es sintetizado a partir de precursores por parte de células gliales o microgliales locales (Vamos et al., 2009). Esta característica además limita su posible administración sistémica con fines terapéuticos, y es por ello que se han desarrollado distintos análogos modificados del KYNA que pueden atravesar la BHE con mayor facilidad, aunque a veces la potencia de estos compuestos sea menor que la de la molécula original (Stone, 1993; Fuvesi et al., 2004; Marosi et al., 2010). La corteza cerebral, en sus distintas regiones, suele tener niveles más bien bajos de KYNA respecto a otras regiones cerebrales, sin embargo, el hipocampo parece tener la concentración basal más alta de KYNA de

entre las diversas regiones corticales (Turski et al., 1988; Swartz et al., 1990). Además de sus reconocidas propiedades como antagonista de distintos receptores, existe evidencia experimental *in vitro* que demuestra efectos antioxidantes directos del KYNA, ya que se ha demostrado que posee una capacidad significativa de atrapar tanto radicales hidroxilo como superóxido (Goda et al., 1999; Hardeland & Zsizsik, 1997; Zsizsik & Hardeland, 2001).

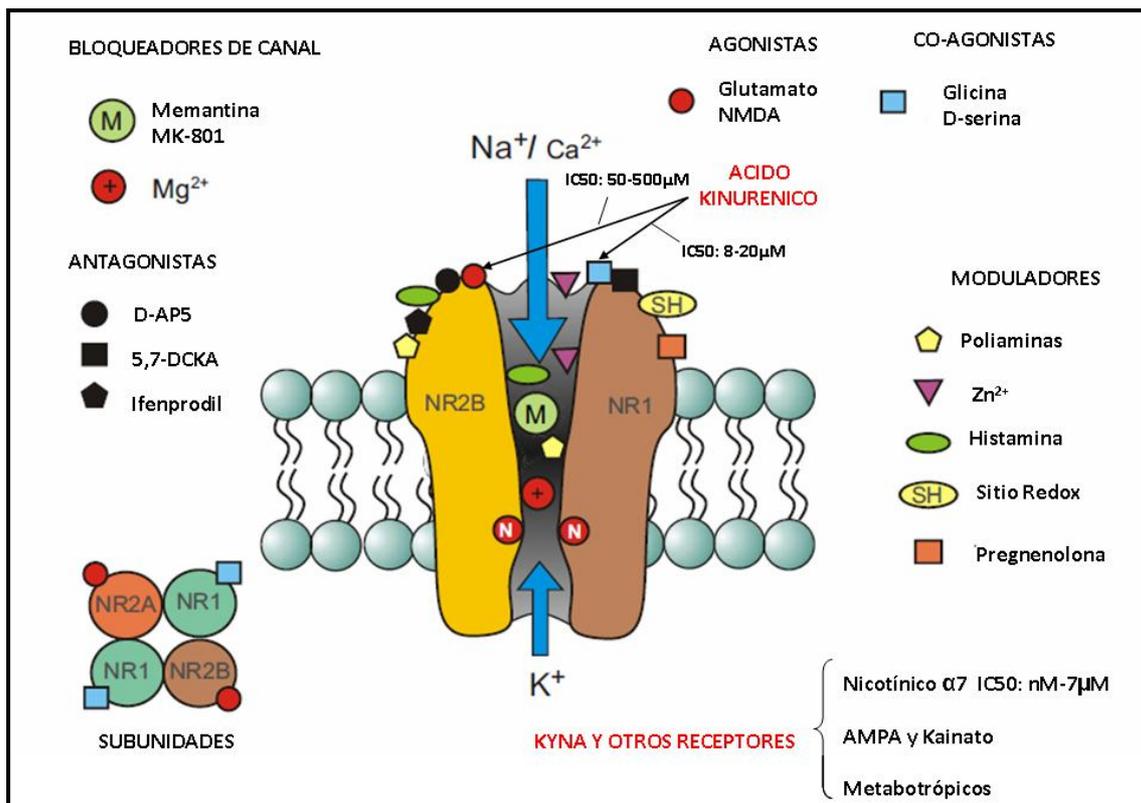


Figura 2. Esquema que ilustra la topología del receptor ionotrópico de tipo NMDA del glutamato, sus sitios y fármacos agonistas, co-agonistas, moduladores, bloqueadores y antagonistas; así como los sitios de unión del KYNA y sus concentraciones inhibitorias (Basado en Parsons et al., 2007).

1. 4 Manipulación farmacológica de la VK.

Desde la descripción inicial de las propiedades bloqueadoras del KYNA sobre distintos receptores de neurotransmisores, se han realizado múltiples abordajes farmacológicos como estrategia de neuroprotección por medio de la producción endógena de KYNA (Wu et al., 1992; Stone, 2000). La utilización de precursores

(triptofano, L-KYN), inhibidores enzimáticos de la kinurenina hidroxilasa y/o kinureninasa (NICALA, meta-nitrobenzoalalina), e inhibidores de la excreción de KYNA (Probenecid), constituyen estrategias neuroprotectoras eficaces y se han utilizado con éxito a nivel experimental desde hace casi 20 años (Moroni et al 1991; Vecsei et al., 1992; Vecsei & Miller, 1992; Miller et al., 1992; Carpenedo et al., 1994; Pellicciari et al., 1994). En el estudio llevado a cabo por Miller y cols. (1992) se demostró que la administración sistémica del precursor L-KYN, y del inhibidor inespecífico del transporte de ácidos orgánicos probenecid (PROB) que inhibe la excreción cerebral de KYNA, empleados tanto de forma aislada como en combinación provocaron un incremento, dependiente de la dosis, del contenido de KYNA en dializados estriatales del orden de 1300 veces respecto de los niveles de KYNA basales. Dicho aumento representa una concentración de KYNA de aproximadamente 13 μM , concentración que se encuentra en los rangos de acción del KYNA sobre los sitios de glicina de los NMDAr (Miller et al 1992; Stone, 1993). Basado en este y otros estudios similares acerca de la modulación de la VK con la finalidad de incrementar los niveles cerebrales de KYNA (Swartz et al., 1990; Speciale et al., 1990), la administración sistémica del precursor L-KYN, que cruza fácilmente la barrera hematoencefálica, y de PROB, ya se han utilizado previamente como estrategia de neuroprotección exitosa en distintos modelos de daño: epilepsia, toxicidad por QUIN, isquemia, etc. (Vecsei et al., 1992; Harris, 1993; Santamaría et al., 1996; Miranda et al 1997; 1999; Stone, 2000; Hlinak & Krejci, 2006; Gigler et al 2007; Robotka et al 2008; Sas et al., 2008; Silva-Adaya et al., 2010). Sin embargo, la utilidad es esta estrategia de manipulación farmacológica aún no se ha probado en modelos de lesión hipocampal por A β .

2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1 Generalidades.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia a nivel mundial; representa entre el 75-80% del total de casos de demencia, afecta al 5% de la población mayor de 65 años, y hasta el 30% de la población mayor de 85 años. La incidencia de la enfermedad se ha incrementado en las últimas décadas debido, entre otras cosas, al incremento en la expectativa de vida, y es por este motivo que se calcula que esta incidencia se duplicará aproximadamente cada 20 años (Joshi & Morley, 2006). Se estima una prevalencia de más de 24.3 millones de pacientes a nivel mundial, y una incidencia anual de 4.6 millones de casos nuevos (Ferri et al., 2005). Para el año 2001, más del 60% de los casos se encontraban en países en vías de desarrollo, y según predicciones, esta cifra se incrementará hasta un 71% en el año 2040. Los costos totales para la atención de estos pacientes en servicios de salud se estiman entre 5.6 y 88 billones de dólares anuales, con un costo por paciente de entre 1,500 a 91,000 dólares anuales (Bloom et al., 2003).

De forma global se considera que el 90% de los casos de EA son esporádicos, y sólo el 10% de ellos exhibe algún patrón hereditario generalmente autosómico dominante, lo cual comúnmente se asocia a un inicio temprano de la sintomatología (<65 años) (Cummings, 2004). La mayoría de los casos de EA son de inicio tardío (94% aproximadamente) y hasta el momento, sólo el polimorfismo del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE4) se ha relacionado consistentemente con el riesgo del desarrollo de la EA de inicio tardío, aunque se han descrito otros múltiples *loci* cromosómicos asociados a la enfermedad (cromosoma 1, 7 y 8). A pesar de que pueden observarse patrones de herencia mendelianos (dominantes autosómicos

casi siempre), la presentación tardía tiende a ser considerada como poligénica y multifactorial (Butler et al., 2009). Se estima que las mutaciones de la proteína precursora de amiloide (PPA), y la presenilina 1 (PS1) y 2 (PS2), localizadas en los cromosomas 21, 14 y 1, respectivamente, son las responsables de hasta el 71% los casos de EA de inicio temprano con herencia autosómica dominante, aunque sólo explican el 0.5 % de todos los casos de EA. Más aún, no todos los casos de inicio temprano exhiben un patrón autosómico dominante, por lo que se considera que hasta un 50 % de ellos no están asociados a mutaciones en ninguno de estos tres genes, lo que indica que esta formas agresivas de inicio temprano están influenciadas por factores genéticos aún desconocidos (Ertekin-Taner, 2007). Bioquímicamente, las mutaciones asociadas a PS1 y PS2 producen un incremento selectivo de los niveles del péptido beta-amiloide 1-42 ($A\beta_{42}$), el cual tiende a agregarse y a depositarse rápidamente. Por otro lado, las mutaciones en la PPA pueden incrementar selectivamente al péptido $A\beta_{42}$, aumentar la producción global de $A\beta$, o generar otras variantes altamente fibrillogénicas de $A\beta$ (Vetrivel & Thinakaran, 2006). Las manifestaciones asociadas a la enfermedad son múltiples, pero predominan las alteraciones precoces y progresivas de la memoria y el aprendizaje, así como alteraciones del juicio y pensamiento abstracto, trastornos neuropsiquiátricos, autonómicos, motores, etc. (Cummings, 2004). Los mecanismos fisiopatológicos que originan la enfermedad aún no se conocen con precisión, pero se discuten una gran variedad de factores implicados: a) Genéticos (mutaciones y alelos); b) Depósito anormal de proteínas y péptidos con mecanismos tóxicos ($A\beta$, proteína tau fosforilada); c) Tóxicos exógenos (aluminio, mercurio); d) Estrés oxidante (deficiencia de antioxidantes, metales de transición, trastornos mitocondriales, etc.); e) Trastornos vasculares (isquemia, hipertensión,

hiperhomocistinemia, etc.); d) Deficiencia de factores tróficos; e) Procesos inflamatorio-infecciosos (citocinas, virus, etc.); y f) Trastornos metabólicos (dieta, dislipidemia, diabetes), etc. (Drachman, 2006). Histopatológicamente, los cambios cerebrales que caracterizan a la enfermedad son: 1) La presencia de depósitos de A β de 38-43 aminoácidos (placas amiloides, neuríticas o difusas); 2) Degeneración neurofibrilar neuronal; 3) Angiopatía amiloide; y 4) Degeneración granulo-vacuolar neuronal con cuerpos de Hirano, entre otros (Braak & Braak, 1991) (Figura 3). Dichos cambios patológicos tienen una distribución topográfica y una evolución temporal característica de la EA; sin embargo, dependiendo del cambio patológico que se estudie (placas amiloides, marañas neurofibrilares, etc.) esta distribución puede variar ampliamente. De forma general puede decirse que los cambios se concentran principalmente a nivel de la corteza transentorrinal, entorrinal, el hipocampo, la amígdala, el cerebro basal anterior y finalmente se han visto involucrados incluso los núcleos diencefálicos, el tallo cerebral y el cuerpo estriado (Braak & Braak, 1991; Thal et al., 2002).

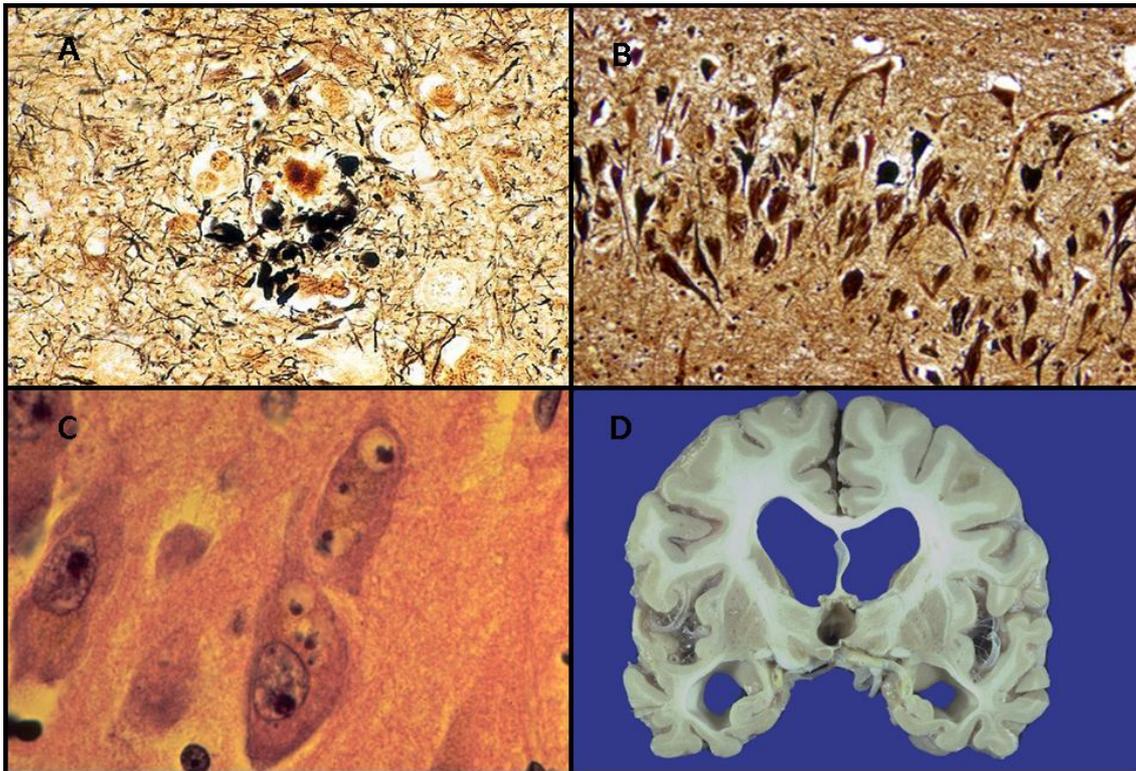


Figura 3. Cambios anatómo-patológicos típicos de la EA. A) Microfotografía de una placa neurítica típica con núcleo amiloide denso rodeado por abundantes neuritas distróficas, e infiltrado micro y astrogliar; B) Microfotografía en donde se observa degeneración neurofibrilar neuronal; C) Microfotografía en donde se observa degeneración granulo-vacuolar neuronal; D) Aspecto macroscópico de un corte coronal de encéfalo en un paciente con EA, destaca la gran atrofia cortical global con predominio en las regiones mediales temporales (hipocampo) (Tomado de Mackenzie, 2007).

2. 2 Hipótesis amiloidea de la enfermedad de Alzheimer.

Una de las hipótesis etiológicas de la EA que más sustento científico continúa teniendo hasta la actualidad es la hipótesis amiloidea; ésta propone que la producción y acumulación excesiva de A β tanto intra como extracelular, y bajo distintos estados físicos y de agregación, es uno de los eventos iniciales y centrales que originan el daño neuronal progresivo característico de la enfermedad (Hardy & Allsop, 1991; Hardy & Higgins, 1992; Eckman & Eckman, 2007). El A β es un péptido de 39 a 42 aminoácidos que es producido normalmente por todas las neuronas mediante el procesamiento proteolítico secuencial de una proteína integral de membrana tipo I denominada PPA, a través de dos complejos enzimáticos, las β y las γ secretasas (Vetrivel & Thinakaran, 2006) (Figura 4).

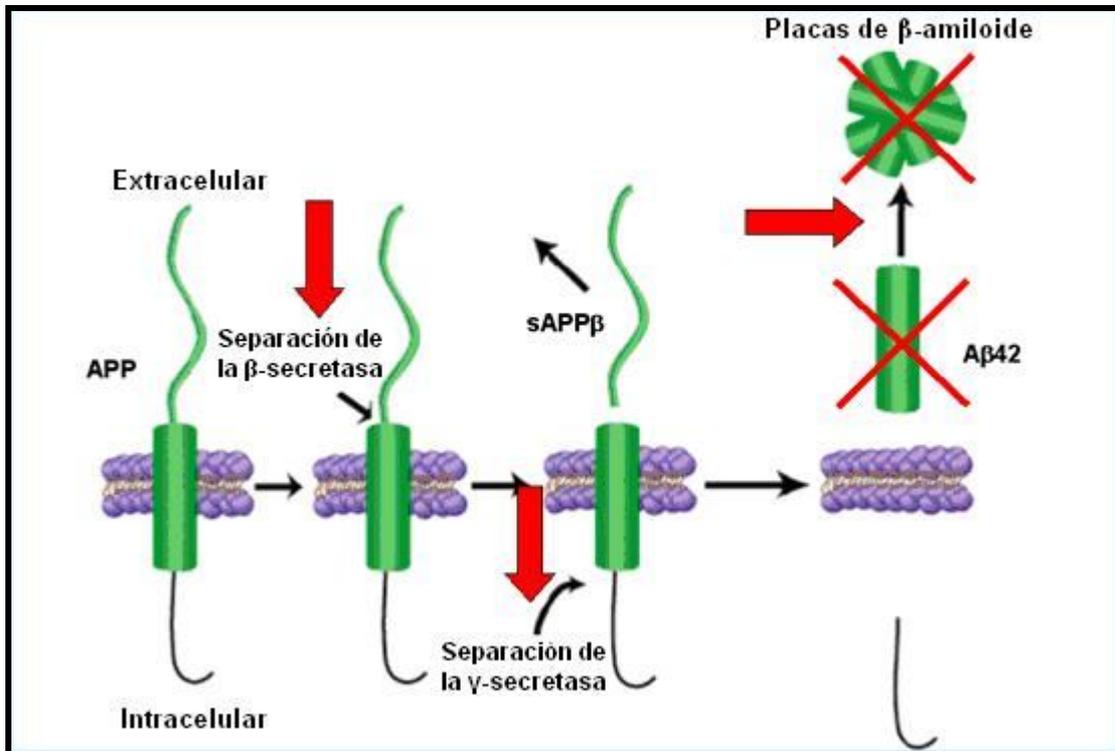


Figura 4. Ilustración que representa la vía proteolítica amiloidogénica de la PPA para producir el péptido Aβ (Tomado de www.epgonline.org).

Experimentalmente se ha demostrado que el Aβ posee propiedades biológicas diferentes y antagónicas: por un lado presenta propiedades tróficas e incluso antioxidantes, y por otro, presenta una gran variedad de mecanismos tóxicos (Atwood et al., 2003). Esta divergencia en sus efectos puede explicarse por las distintas variables o circunstancias empleadas en los diversos estudios publicados, como son la estirpe y edad de las células o tejidos usados, la dosis, la secuencia del péptido, el estado de fibrilación y agregación, y el abordaje experimental, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Yankner et al., 1990; Kowall et al., 1992; Smith et al., 2002; Irie et al., 2005; Goto et al., 2006; Schmid et al., 2008). La obtención experimental de diferentes fragmentos a partir de la secuencia completa del Aβ ha permitido identificar y estudiar las secuencias de aminoácidos que resultan críticas para ejercer sus diversos efectos tóxicos. En este sentido, el segmento 25-35 del Aβ

posee la mayoría de las propiedades tóxicas del péptido completo (excepto que carece de los sitios de unión a metales), motivo por el cual la administración exógena es ampliamente utilizada para reproducir experimentalmente los procesos en los que está involucrado el A β en la patogenia de la EA (Yankner et al., 1990; Kowall et al., 1992; Chen et al., 1996; Delobette et al., 1997; Canevari et al., 1999; Rovira et al., 2002; Trubetskaya et al., 2003; Stepanichev et al., 2004; Lau et al., 2007). En múltiples estudios se ha demostrado que las propiedades tóxicas del A β están mediadas por varios mecanismos, como son el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial, las alteraciones en la permeabilidad membranal, la inflamación, la disfunción sináptica, y la excitotoxicidad a través de su interacción con receptores de diversos neurotransmisores, etc. (Canevari et al., 1999; Lin et al., 2001; Rosales-Corral et al., 2004; Butterfield et al., 2007; Parameshwaran, et al., 2008). Al respecto de este último mecanismo, se ha comprobado que el A β puede interactuar eficazmente con los sitios de glutamato y glicina del receptor NMDA del glutamato (NMDAr) produciendo activación sostenida con entrada masiva de Ca²⁺ intracelular y muerte neuronal (Cowburn et al., 1997; Michaelis, 1998; Harkany et al., 2000). Este daño excitotóxico es considerado como uno de los principales procesos responsables de la neurodegeneración en la EA (Hynd et al., 2004), hecho que además está fuertemente apoyado por diversas observaciones: por un lado experimentales, en las que se ha demostrado que el uso de fármacos antagonistas de los NMDAr disminuye el daño neuronal y los síntomas conductuales inducidos por A β , y por otro lado clínicas, en las que se ha evidenciado que el uso de antagonistas NMDAr (memantina) mejora algunos parámetros clínicos en pacientes con EA moderada a severa (Wenk et al., 2006; Parsons et al., 2007; Farlow & Cummings, 2007).

2. 3 Receptores glutamatérgicos

El glutamato es el neurotransmisor más abundante en todo el sistema nervioso de los mamíferos y su acción esta mediada a través de dos grandes clases de receptores glutamatérgicos: los ionotrópicos y los metabotrópicos (Kew & Kemp, 2005). **Receptores ionotrópicos.** Existen tres tipos principales de receptores ionotrópicos, y estos se han denominado de acuerdo al agonista que selectivamente los activa y ha permitido identificarlos: 1) NMDA (N-metil-D-aspartato); 2) AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolpropionico) y 3) Kainato (2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina). Estos receptores ionotrópicos son estructuras tetraméricas compuestas de más de un tipo de subunidad y difieren de la estructura clásica de los receptores con 4 dominios transmembranales como el caso del receptor nicotínico de acetilcolina (Mayer & Armstrong, 2004). Receptores NMDA: La familia de receptores NMDA está compuesta por 7 subunidades diferentes que son producto de genes separados, no obstante, la homología en la secuencia de aminoácidos entre las distintas subunidades es de entre 27-50%. Los receptores NMDA funcionales siempre están compuestos por una subunidad NR1 y al menos una subunidad NR2 ó una subunidad NR1 mas una subunidad NR2 y una NR3 (Kew & Kemp, 2005). Los NMDAr que contienen subunidades NR2 y NR3 tienen una distribución espacio temporal particular en el tejido nervioso. Los NR2A y NR2B son muy abundantes en el prosencéfalo, mientras que los NR2C se expresan abundantemente en las neuronas granulares del cerebelo y algunos núcleos del tallo cerebral; finalmente los NR2D se expresan más en el diencéfalo y mesencéfalo pero solo durante las etapas tempranas del desarrollo. Por otro lado los NR3A se expresan predominantemente durante el neurodesarrollo aunque pueden persistir en la edad adulta, y los NR3B se expresan en las motoneuronas somáticas del tallo y la

medula espinal (Rigby et al 1996; Nishi et al 2001). El NMDAr resulta único entre los canales iónicos activados por ligando ya que requiere de la presencia de dos agonistas de forma obligatoria para poder activarse: glutamato y glicina (sitios de unión localizados en la subunidad NR2 y NR1 respectivamente), además de que se ha demostrado que la activación depende de la unión en dos sitios de glicina y dos sitios de glutamato de forma independiente lo cual obliga a que los receptores funcionales contengan 2 subunidades NR1 y 2 subunidades NR2 (Mayer & Armstrong, 2004). Además de las características de sus ligandos, el NMDAr también resulta muy especial debido a que además requiere para su activación de la despolarización previa de la membrana celular para que sea retirado el ion Mg^{2+} que funciona como “tapón” del poro del canal; esta característica hace que el canal NMDA dependa de la activación previa de otros receptores como los AMPA (Hynd et al 2004). Aunado a todo lo anterior, el NMDAr posee además una gran diversidad de sitios de modulación y regulación en su estructura, lo cual le confiere propiedades funcionales tremendamente versátiles y a veces poco predecibles, pudiendo participar simultáneamente tanto en procesos patológicos como la excitotoxicidad, como en procesos fisiológicos como el aprendizaje y la memoria (Riedel et al., 2003; Hynd et al., 2004) (Figura 2).

	Clase	Subtipos: Subunidades	Acción	
Glutamato	Ionotrópicos	NMDA: NR1; NR2A-D; NR3A y B	↓ Ca ²⁺ Na ⁺	
		AMPA: GluR1-4	↓ Na ⁺ (Ca ²⁺)	
		Kainato: GluR5-7; KA-1 y KA-2.	↓ Na ⁺ (Ca ²⁺)	
	Metabotrópicos	Grupo I: mGluR1 y mGluR5	G _q /G ₁₁	↑ FLC
		Grupo II: mGluR2 y mGluR3		
		Grupo III: mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8	G _i /G _o	↓ AC

Figura 5. Cuadro sinóptico de la familia de receptores glutamatérgicos, sus clases, subtipos, subunidades conocidas y acciones (FLC: Fosfolipasa C; AC: Adenilato-ciclasa).

2.4 Disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer: Papel del Aβ y los receptores NMDA.

En diversos estudios se ha demostrado que la severidad de la pérdida sináptica se correlaciona mejor con el deterioro cognitivo observado en los pacientes con EA que con la cantidad de depósitos de Aβ (placas neuríticas) o las lesiones neurofibrilares (Bertoni-Freddari et al., 1990; 1996; Selkoe, 2002). En algunos estudios se demuestra una reducción de entre 25-30% del número de sinapsis en la corteza cerebral de pacientes con EA, además de una disminución de entre el 15-35% en el número de sinapsis que presenta cada neurona. En otros estudios se ha demostrado una reducción en proteínas tanto presinápticas (sinaptofisina) como postsinápticas (sinaptopodina y PSD-95) en pacientes con EA respecto de controles sanos (Reddy & Beal, 2007). Se ha confirmado también que las alteraciones de la transmisión sináptica ocurren mucho tiempo antes que las lesiones neuropatológicas típicas en los modelos transgénicos de EA (Oddo et al., 2003). En estudios *in vivo* y en

rebanadas de tejido ha demostrado que los oligómeros, tanto sintéticos como naturalmente secretados de A β , son capaces de disminuir la potenciación a largo plazo (LTP), efecto que no fue replicado por las formas fibrilares del A β (Walsh et al., 2002). El mecanismo por el cual los oligómeros de A β alteran la transmisión sináptica no se conoce con precisión, pero se ha demostrado que el A β disminuye la presencia de la proteína PSD-95, además que es capaz de regular de forma negativa los receptores glutamatérgicos AMPA (GluR1) y los NMDA a través de diversos mecanismos, como la endocitosis, la disminución en la expresión de algunas subunidades, etc. (Cerpa et al., 2008). A pesar de que el foco de atención en la actualidad son los daños generados por las formas solubles del A β , en los estudios experimentales también se ha demostrado que las formas fibrilares contribuyen, al menos, con la persistencia del daño sináptico en la EA (Tsai et al., 2004). Aunque existe quien afirma que el daño de las sinapsis a lo largo de la evolución de la enfermedad también es producido solo por las formas solubles del A β , esto por la limitante teórica, de que las formas fibrilares depositadas tendrían una menor oportunidad de interactuar dinámicamente con los receptores o las proteínas que son afectadas en las terminales sinápticas (Cerpa et al., 2008). En estudios usando agregados de A β se ha demostrado que estos son capaces de inhibir la LTP dependiente de NMDAr, pero no modifican la LTP que es independiente del NMDAr. Mas aun se ha demostrado que oligómeros de distintos orígenes son capaces de facilitar otros procesos plásticos sinápticos como la depresión a largo plazo (LTD) en neuronas del sector CA1 del hipocampo, este efecto se asoció a un incremento del glutamato extracelular, que se sugiere es provocado por una alteración en la recaptura de glutamato (Li et al., 2009). Aunque existen muchos estudios en donde se ha demostrado el efecto nocivo del A β sobre

la transmisión sináptica, en realidad no se sabía si se trataba de un efecto pre o postsináptico. Por este motivo, en dos experimentos recientes y paralelos, se estudió el efecto de la administración tanto extra como intracelular de oligómeros de A β , y se encontró que la administración intra-axonal de A β 1-42 (no así de A β 1-40) en una preparación de axón gigante de calamar, altera la transmisión sináptica medida por parámetros de electrofisiología, así como el transporte axonal rápido bidireccional en una forma que depende de la activación de la caseína cinasa 2 (CK-2), en ambos estudios no se encontró efecto de la administración de oligómeros de A β a nivel extracelular (Moreno et al., 2009; Pigino et al., 2009). Recientemente también, se demostró que la actividad sináptica disminuye los niveles intracelulares de A β , por la acción de la neprilisina, pero además se promueve su secreción extracelular, lo cual se asocia a una reducción de la toxicidad sináptica, esta evidencia apoya fuertemente la hipótesis de que el principal mecanismo de toxicidad del A β es intracelular, y además puede ser la evidencia celular del mecanismo protector que representa de la actividad cognitiva continua en el desarrollo de EA (reserva cognitiva) (Tampellini et al., 2009).

Debido a la rapidez con la que ocurre el efecto deletéreo provocado por la infusión experimental de A β sobre distintos parámetros electrofisiológicos como la disminución de la LTP (5 minutos después de la inyección i.c.v.) (Freir et al., 2003), es claro que el efecto negativo primario del A β no es mediado por un mecanismo neurodegenerativo que implique pérdida neuronal o daño tisular severo, sino mas bien por la alteración de mecanismos mucho mas rápidos y mas directamente involucrados con la transmisión sináptica normal, como es la modificación de la actividad de receptores unidos a canales iónicos (receptores ionotrópicos). En este sentido el A β ha demostrado modificar la actividad de los receptores de

neurotransmisores, principalmente del glutamato, de muy distintas formas (Parameshwaran et al., 2008). La relación existente entre el A β y los receptores glutamatérgicos ha demostrado ser muy compleja. Por un lado existe evidencia que apoya que el A β puede interactuar eficazmente con los NMDAr activándolos de forma sostenida provocando un incremento en la entrada de calcio intracelular, que a su vez puede encender distintos mecanismos de daño celular que terminen con la muerte neuronal (excitotoxicidad) (Harkany et al., 2000). Por otro lado, se ha postulado recientemente que el A β ejerce sus efectos negativos sobre la transmisión sináptica, mediante la modulación negativa de los receptores glutamatérgicos, tanto de tipo AMPA como NMDA (Snyder et al., 2005). A primera vista estos efectos parecen contradictorios, debido a que algunas evidencias demuestran una reducción de la actividad de los receptores y otras su sobreactivación. Sin embargo, ambas evidencias pueden reflejar eventos cuantitativa, temporal y espacialmente distintos. Aunque se debe mencionar que las evidencias provienen de experimentos realizados en circunstancias totalmente diferentes, y en la mayoría de estudios se ha demostrado que en el efecto biológico presentado por el A β influyen diversos factores como son: el fragmento del péptido, la dosis, su estado de agregación o fibrilación, el tipo celular empleado, el estado de activación previa del receptor, el tiempo en el que se mide el efecto, el parámetro a medir, etc. (Schmidt et al., 2008). Sin embargo, no se debe olvidar que paralelamente existen experimentos en los que se ha demostrado un papel fisiológico e incluso neuroprotector del A β (Atwood et al., 2003). Conocer el papel fisiológico que juega el A β resulta complejo debido a que en la mayoría de los experimentos se han utilizado dosis muy por encima de las concentraciones fisiológicas observadas en el espacio extracelular (micromolar vs. nanomolar) (Selkoe, 2008). Se ha demostrado que una activación moderada del

NMDA induce un aumento de la actividad de la β -secretasa (BACE) con un incremento en la producción de $A\beta$ que, a su vez, puede producir una regulación negativa de los receptores NMDA y AMPA disminuyendo así la excitabilidad neuronal; estos hallazgos pueden sugerir que el $A\beta$ tiene un papel fisiológico en la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica normal (Lesne et al., 2005; Parameshwaran et al., 2008). Aun no se conoce con exactitud en que momento, o por que causa, este “mecanismo fisiológico” de regulación de la excitación mediado por el $A\beta$, se altera para convertirse en un mecanismo patológico; algunos autores sugieren que el incremento descontrolado en las concentraciones del $A\beta$ provoca una desmedida inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica (AMPA dependiente) y por otro lado una sobre estimulación del los NMDAr que conduce a disfunción sináptica y excitotoxicidad respectivamente (Parameshwaran et al., 2008).

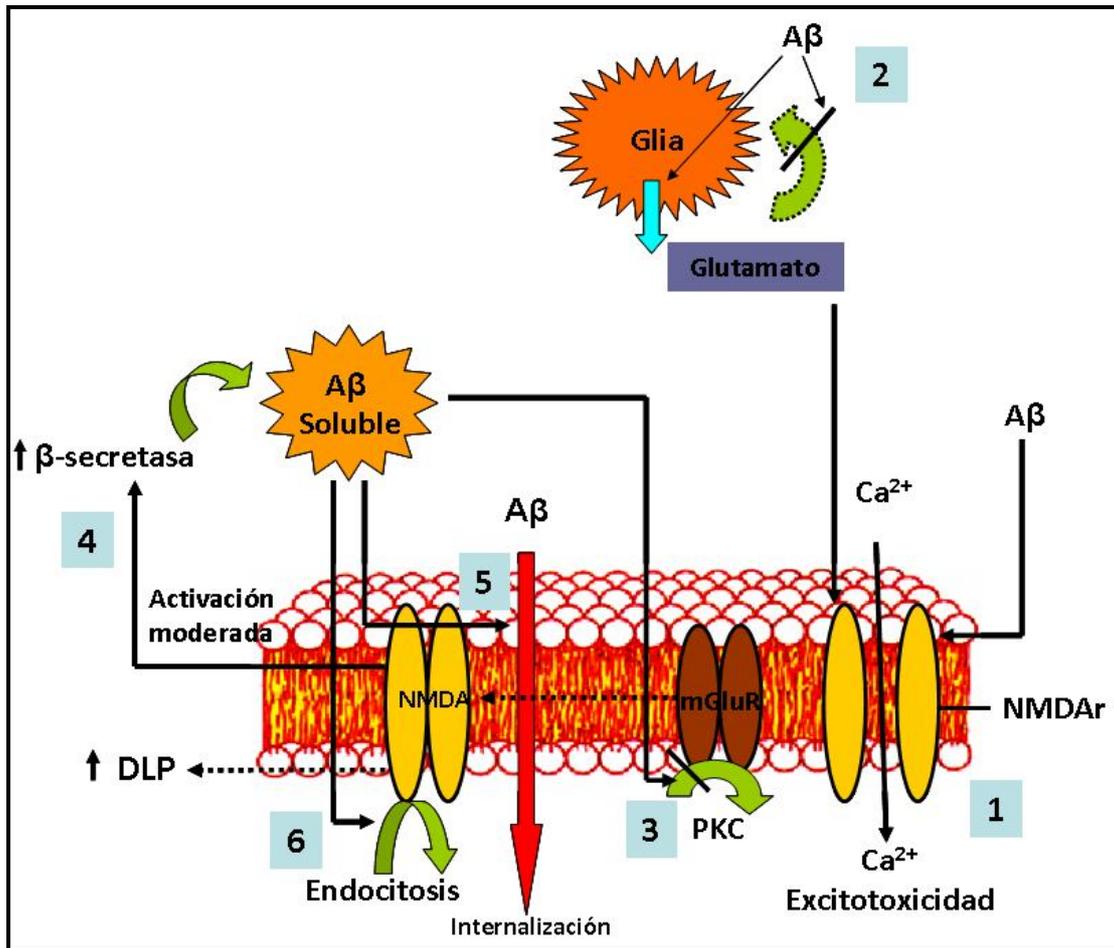


Figura 6. Esquema que resume las interacciones descritas del Aβ con los NMDAR: 1) Aβ sobreactiva los NMDA directamente induciendo excitotoxicidad; 2) Aβ provoca liberación de glutamato glial e inhibe su recaptura; 3) Aβ inhibe la activación de los mGluR mediada por PKC afectando su acción sobre NMDA; 4) La activación moderada de los NMDAR aumenta la actividad de la β-secretasa incrementando la producción de Aβ; 5) Los NMDAR median la internalización de Aβ; 6) Aβ induce la endocitosis de los NMDAR.

Bajo este panorama, la regulación de las interacciones que existen entre los NMDAR y el Aβ, resulta muy promisorio para el desarrollo de blancos de intervención terapéutica por varios aspectos: primero, los estudios recientes sugieren que las formas solubles e intracelulares son las principales responsables del daño ejercido por el Aβ; segundo, se propone que este daño en la EA está inicialmente representado por cambios en la función sináptica, y se sabe que en estos cambios están directamente involucrados los receptores glutamatérgicos ionotrópicos que han demostrado estar modulados por el Aβ. Por este motivo la modulación del

NMDAr ha sido ampliamente utilizada en la prevención y tratamiento del daño inducido por A β en distintos modelos experimentales. Además, es importante resaltar que esta evidencia experimental esta fuertemente apoyada por la evidencia clínica que demuestra que los antagonistas del NMDAr (memantina) resultan de utilidad en el manejo de las etapas moderada a avanzadas de la EA (Farlow & Cummings 2007).

2. 5 Kinureninas y Alzheimer

Las primeras evidencias que se encontraron entre las alteraciones de la VK y la EA arrojaron resultados contradictorios debido a que no se encontraron - como se esperaba -, niveles elevados de QUIN en LCR y tejido cerebral de pacientes con EA (Moroni et al., 1988; Sofic et al., 1989; Mourdian et al., 1989); sin embargo, posteriormente se demostró una participación cada vez mas importante de esta vía en el daño al tejido nervioso observado en la EA. Estas evidencias se puntualizan a continuación:

- Los niveles de triptofano (precursor principal de la síntesis de KYNs) se correlacionan inversamente con el grado de deterioro cognitivo en pacientes con EA (Widner et al., 1999).
- Los niveles de kinurenina están aumentados en suero de pacientes con EA, y se correlacionan con el grado de deterioro cognitivo (Baran et al., 1999).
- La administración de A β 1-42 induce la producción de QUIN en macrófagos aislados humanos (Guillemin et al., 2001).
- La exposición de macrófagos y microglia aislados al A β 1-42 agregado induce la producción de QUIN, aunque no ocurre así con el péptido A β 1-40 (Guillemin et al., 2003).

- En estudios de inmunohistoquímica se encontró un incremento de la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO, principal enzima reguladora de la VK, y de la producción del QUIN) en astrocitos, microglia y neuronas del hipocampo de pacientes con EA, encontrándose una concentración máxima en la periferia de las placas seniles, e incluso observándose depósitos granulares en las neuronas corticales y unidos a las marañas neurofibrilares (Guillemin et al., 2005; Bonda et al., 2010).
- Disminución en los niveles de KYNA en células sanguíneas y suero de pacientes con EA, sin cambio en la actividad de las enzimas KAT I y KAT II (Hartai et al., 2007).
- La exposición a interferón gamma incrementa la producción de la enzima IDO en células monocíticas (THP1) previamente expuestas a A β 1-42, pero esto no ocurre con la exposición a A β 1-40 o A β 25-35, ni con la estimulación con IL-1, IL-6 o TNF alfa (Yamada et al., 2009).
- El QUIN induce la fosforilación de la proteína Tau en cultivos de neuronas corticales humanas, y este efecto es revertido por el uso de antagonistas del NMDAr (Rahman et al., 2009).
- Los niveles plasmáticos disminuidos de KYNA y elevados de QUIN en pacientes con EA; además se observó correlación positiva entre el deterioro cognitivo y los niveles de KYNA, así como una correlación inversa con los niveles de QUIN (Gulaj et al., 2010).
- Los niveles séricos elevados de anticuerpos del isotipo IgA en contra de metabolitos de la vía de kinurenina (KYNA, QUIN, 3HK, 3HAA; AA) en pacientes con EA (Duleu et al., 2008; Duleu et al., 2010).

De forma global podemos señalar que existe una cantidad considerable de evidencia directa de la disfunción de la VK en el sistema nervioso de los pacientes

con EA. Además existe evidencia indirecta que sugiere que debido a que existe una participación importante de los mecanismos inflamatorios en la EA (Hoozemans et al., 2006), la activación de las células involucradas en las respuesta inflamatoria (macrófagos, microglia, etc.) produce la liberación de distintas citocinas proinflamatorias que inducen la producción de toxinas derivadas de la VK (como la 3-HK y el QUIN), produciendo así a un desbalance entre la producción de metabolitos tóxicos y de antagonistas (KYNA), lo cual contribuye finalmente al daño neuronal mediado por la activación de NMDAr y el estrés oxidante (Guillemin & Brew, 2002). Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad, también existe evidencia clínica que recientemente ha mostrado una correlación entre los niveles séricos elevados de KYNA y el deterioro cognitivo en pacientes con EA, por lo que éste antagonista endógeno puede estar jugando en realidad un papel deletéreo sobre la transmisión glutamatérgica y colinérgica normal, como la involucrada en los procesos de aprendizaje-memoria, que es precisamente uno de los procesos cognitivos mas precozmente afectados en la EA (Gulaj et al., 2010).

2. 6 Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer

A pesar de todo el desarrollo tecnológico y la investigación básica aplicada a la EA, hasta el momento no existe ningún modelo que recapitule de forma absoluta todas las características tanto anatomopatológicas, como neuroquímicas, conductuales y el patrón de progresión observado en la EA (Radde et al., 2008; Manzano et al., 2009). Se considera de forma general que el modelo experimental ideal debería reunir todas las características antes mencionadas, sin embargo, pocos modelos logran reproducir todas estas características (Oddo et al., 2003). Por otro lado, cuando mas cerca se ha estado de emularlas por completo, esto ha requerido de

una manipulación experimental (generalmente genética) tan compleja y profunda que dichas circunstancias en si mismas, paradójicamente alejan al modelo de lo que realmente ocurre en la EA en el ser humano; enfermedad en la que la mayor parte de los casos tienen una presentación esporádica de inicio tardío y no asociada a ninguna alteración genética (Gotz et al., 2004). De forma global los modelos experimentales de la EA pueden dividirse en: **1) Modelos tóxicos:** los modelos de lesión tóxica fueron los primeros que se implementaron en el estudio de la EA, estos modelos se originaron de la observación de los efectos amnésicos del fármaco anticolinérgico escopolamina que derivó además en una de la teorías iniciales de la fisiopatología de la EA, la teoría de la disfunción colinérgica, que hasta la fecha tiene respaldo incluso a nivel del tratamiento clínico de la EA (Shiosaka, 1992; Lanctot et al., 2003). Estos modelos implican la administración de algún fármaco que provoque deterioro cognitivo (generalmente de alguna variedad de memoria) afectando los sistemas de neurotransmisión o señalización implicados en las dichas tareas cognitivas, tales como anticolinérgicos, bloqueadores glutamatérgicos, bloqueadores adrenérgicos, benzodiazepinas, inhibidores de síntesis de proteínas, etc. (Izaute & Bacon, 2005). Sin embargo, en la actualidad estos modelos deben ser considerados más como modelos de amnesia que de la EA, ya que solo reproducen algunas alteraciones cognitivas agudas y reversibles, sin reproducir los cambios anatómicos, ni la progresión de la enfermedad (Smith, 1988).

Tabla 1. Comparativo de los efectos biológicos de los péptidos A β 1-40 o 42 vs. A β 25-35 y su sustento bibliográfico.

PROPIEDAD BIOLÓGICA	A β 1-40 ó 1-42	A β 25-35
Estrés oxidante	Butterfield et al., 2007	Café et al 1996; Stepanichev et al., 2004; Stepanichev et al., 2008.
Unión a metales	Kontush, 2001	Carece de sitios de unión
Alteraciones membranales	Lin et al., 2001	Lau et al., 2007
Alteración de la homeostasis del calcio	Kawahara & Kuroda, 2000; Ferreiro et al., 2004	Brorson et al 1995; He et al., 2002; Ferreiro et al., 2004.
Unión a receptores o canales	Nicotínicos (Pym et al., 2007) Glutamatérgicos (Harkany 2000; Tozaki et al 2002; Parameshwaran et al., 2008)	Glutamatérgicos y canales de calcio (Cowburn et al 1997; Rovira et al., 2002; Zhang et al., 2009)
Disfunción sináptica	Parameshwaran et al., 2008	Holscher et al., 2007
Disfunción mitocondrial	Wang et al., 2007	Canevari et al., 1999
Alteraciones de memoria	Cleary et al., 1995; Jhoo et al., 2004.	Chen et al., 1996; Delobette et al.,1997; Stepanichev et al., 2004; Holscher et al., 2007
Apoptosis	Tamagno et al., 2003	Li et al., 1996; Clementi et al., 2005
Necrosis	Mook-Jung et al., 1997.	Kowall et al., 1992; Behl et al.,1994.
Inflamación	Rosales-Corral et al., 2004	Meda et al., 1999
Tróficas o antioxidantes	Atwood et al., 2003; Niidome et al., 2009	Walter et al., 1997

En este sentido la administración exógena de distintos fragmentos tóxicos del A β (25-25;1-42;1-40) puede considerarse una variante de estos modelos y se utiliza ampliamente en la literatura científica actual debido a la accesibilidad y sencillez de su metodología, a que puede utilizarse tanto *in vitro* en células aisladas como *in vivo* con administración intracerebral, y a que reproduce tanto los efectos conductuales, las alteraciones sinápticas, los cambios neuroquímicos y los efectos tóxicos neuronales que se observan en la enfermedad, pero no las lesiones anatomopatológicas, ni la progresión de la enfermedad (Stephan & Phillips, 2005; Kaminsky et al., 2010) (Tabla 1). **2) Modelos transgénicos:** estos incluyen la introducción de mutaciones en modelos murinos como las observadas en la EA de inicio temprano ya sea en el gen de la PPA, la PS1 y PS2 e incluso en la proteína Tau (Chapman et al., 2001; Sarasa, 2006; Manzano et al., 2009). En la mayoría de

los modelos transgénicos murinos se han logrado reproducir las lesiones patológicas típicas de la EA (placas neuríticas y degeneración neurofibrilar neuronal), a veces de forma aislada y a veces en combinación, así como los cambios inflamatorios, los depósitos vasculares, el deterioro cognitivo progresivo, y la disfunción sináptica, sin embargo, estos modelos no han demostrado reproducir la pérdida neuronal severa que suele observarse en la EA, ni la distribución espacio-temporal típica de las lesiones patológicas observadas en la EA, por otro lado, dada la manipulación genética, resulta prácticamente imposible hacer comparaciones rigurosas entre las distintas líneas de ratones transgénicos, a lo cual se debe agregar que su obtención y manutención resulta costosa y poco accesible universalmente (Gotz et al., 2004; Chapman et al., 2001). A pesar de que suele considerarse que los modelos transgénicos son por el momento los modelos más cercanos a lo ideal en la EA, no se debe perder de vista que los modelos mas cercanos suelen implicar a veces más de tres mutaciones, evento que en los pacientes con EA nunca ha sido documentado. Se debe discutir además esta obligatoriedad de que los modelos experimentales desarrollen las lesiones patognomónicas de la EA cuando actualmente aun se discute su papel en la fisiopatología de la enfermedad e incluso para las placas seniles por ejemplo, la correlación con el deterioro cognitivo clínico no es estrecha (Kern & Behl, 2009; Treusch et al., 2009)

3. ANTAGONISTAS NMDA: EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA Y EL PROCESO APRENDIZAJE-MEMORIA

A pesar de sus propiedades neuroprotectoras ampliamente comprobadas, todos los antagonistas del NMDAr tienen la capacidad potencial de inducir efectos colaterales indeseables tales como alucinaciones, náusea, vómito, alteraciones de la presión sanguínea y diversas alteraciones motoras (agitación, ataxia, temblor, conductas estereotipadas, e incluso la capacidad de inducir conductas adictivas). Todos estos efectos se han comprobado tanto a nivel experimental como a nivel clínico (Muir & Lees, 1995; Muir, 2006). Esta evidencia ha contribuido a limitar su utilidad clínica y constituye un factor de confusión al evaluar sus efectos a nivel experimental (Ikonomidou & Turski, 2002). Se ha comprobado que diversos antagonistas de NMDAr, tanto competitivos como no competitivos, son capaces de inducir serias alteraciones motoras; según algunos estudios, la capacidad de los antagonistas para NMDAr de inducir alteraciones motoras está en relación directa con sus efectos anticonvulsivos presentados experimentalmente (Carter, 1992). Inicialmente, algunos estudios sugerían que los antagonistas NMDAr que interactúan con el sitio co-agonista de glicina del receptor no producían dichas alteraciones motoras (Koek & Colpaert, 1990); sin embargo, en estudios posteriores se ha demostrado que el bloqueo del sitio glicina B del NMDA con el uso de KYNA induce de igual forma conductas estereotipadas y ataxia en animales de experimentación, cuya magnitud está en relación directa con la dosis, mientras que la administración de su precursor metabólico, la L-KYN, produce aparentemente sólo modificaciones leves de la conducta motora (Vecsei & Beal, 1990).

Por otro lado, se conoce muy bien la participación de los NMDAr en los procesos de plasticidad sináptica ligados al desarrollo de aprendizaje y memoria (Riedel et al.,

2003), por lo que no es de sorprender que en animales intactos, la administración de diversos bloqueadores de los NMDAr puede alterar distintas formas de aprendizaje y memoria a nivel experimental (Ahlander et al., 1999; Chess et al., 2007; Chess et al., 2009). En contraste, existe evidencia experimental y clínica que ha demostrado que el uso de antagonistas NMDAr puede incluso mejorar los procesos de aprendizaje-memoria en sujetos sanos, aunque el mecanismo por el cual ocurre no se conoce con precisión (Mondadori et al., 1989; Lederer et al., 1993; Zoladz et al., 2006; Parsons et al., 2007). Así, la modulación del NMDAr como estrategia terapéutica, a pesar de su limitado éxito clínico en patologías como el infarto cerebral y el trauma encefálico, ofrece aún la posibilidad de prevenir o limitar el daño ocasionado en otras enfermedades como las neurodegenerativas; el ejemplo más claro de esto es el éxito a nivel mundial de la utilización clínica de la memantina en la EA moderada a severa (Kemp & McKernan, 2002).

JUSTIFICACIÓN.

Los efectos neuroprotectores del incremento endógeno del KYNA mediante la administración sistémica de L-KYN y/o PROB ya se han demostrado previamente usando distintos modelos neurotóxicos. Sin embargo, estos efectos aún no se han estudiado en el modelo de daño hipocampal por A β , por lo que el objetivo del presente estudio es evidenciar los efectos conductuales (sobre la memoria espacial de largo plazo y la conducta motora espontánea), así como los efectos morfológicos de esta intervención farmacológica, comparándolos con los efectos obtenidos con un antagonista prototípico de los NMDAr, el MK-801 (dizocilpina).

OBJETIVOS:

Objetivo general.

Demostrar los efectos conductuales y morfológicos de la manipulación farmacológica de la VK en el modelo de lesión toxica con A β .

Objetivos particulares.

1. Demostrar que la manipulación farmacológica de la VK usando L-KYN y/o PROB es metodológicamente factible y potencialmente terapéutica en el modelo de lesión por A β 25-35 soluble.
2. Evidenciar los efectos agudos y subagudos de la administración sistémica de L-KYN y/o PROB sobre la conducta motora espontánea.
3. Conocer los efectos de la administración sistémica de L-KYN y/o PROB sobre el deterioro de memoria espacial de largo plazo inducido por la administración intrahipocampal de A β 25-35 soluble.
4. Evidenciar los efectos morfológicos en el hipocampo de la administración de L-KYN y/o PROB sobre el daño inducido por A β 25-35 soluble.
5. En todos los casos se compararán los efectos del uso de L-KYN y/o PROB con los efectos generados por el antagonista no competitivo típico: MK-801.

HIPÓTESIS

Si la administración sistémica de L-KYN y/o PROB incrementa los niveles cerebrales de KYNA esto ejercerá un efecto neuroprotector que se reflejará en una reducción del deterioro de memoria espacial inducido por A β , y una disminución el daño neuronal provocado por el A β a nivel hipocampal. Por otro lado, se espera que esta manipulación farmacológica no afecte de forma significativa la conducta motora presentada por los animales de experimentación.

METODOLOGIA.

1. REACTIVOS.

Todos los reactivos y sustancias químicas empleadas para la realización de este proyecto fueron de grado analítico exclusivamente. El A β 25-35, la extravidin peroxidasa y el MK-801 (Dizocilpina) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El PROB empleado se obtuvo de MP Biomedicals (Fountain Parkway Solon, Ohio, USA). La L-KYN fue sintetizada por Sai Advantium Pharma, Ltd. (Hyderabad, India) y fue donada amablemente por el Dr. Robert Schwarcz del Maryland Psychiatric Research Center (University of Maryland School of Medicine, Baltimore). El anticuerpo monoclonal primario contra GFAP se obtuvo de Millipore (Temecula, CA, USA). El agua desionizada para la preparación de las soluciones y reactivos se obtuvo de un sistema de filtración de agua Milli-RQ system (Millipore, MA, USA). La L-KYN y el PROB se disolvieron en una solución 0.1 N de NaOH, ajustando el pH de la solución a valores finales de 10.0 usando HCl, de acuerdo a lo descrito anteriormente (Santamaría et al., 1996). Para disolver el A β 25-35 y como vehículo se utilizó amortiguador salino de fosfatos (PBS) con pH de 7.4. Para anestésiar a los animales de experimentación se utilizó pentobarbital sódico de uso veterinario comercial (Anestesal, Pfizer de México S.A. de C.V.).

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para la realización de este proyecto se utilizaron un total de 63 ratas macho de de la cepa Wistar, con un peso entre 250-300g. Todos los experimentos se llevaron a cabo con estricto apego a las recomendaciones contenidas en la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” emitida por los Institutos Nacionales de Salud de E.U. (1996), y fueron autorizados por el comité institucional sobre

cuidado y uso de animales de laboratorio. Para todos los propósitos del proyecto los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura (25+/- 3°C) y humedad (50 % +/- 10), con ciclos regulares de luz y oscuridad de 12 h c/u. Los animales de experimentación fueron alojados 5 por caja y recibieron durante todo el experimento agua y alimento *ad libitum*. Durante el proyecto además se intentó disminuir al máximo el sufrimiento de los animales y se trató de emplear el menor número posible de los mismos.

3. GRUPOS EXPERIMENTALES Y CIRUGIA ESTEREOTAXICA

Se formaron 9 grupos experimentales con 7-8 animales cada uno de la siguiente manera: **1) Control:** recibió 1 μ L de vehículo (PBS) intra-hipocampal bilateral (IHB) y 0.4 mL de PBS por vía intraperitoneal (i.p.); **2) Grupo de A β 25-35:** recibió A β IHB (1 μ L, 100 μ M) + 0.4mL de PBS i.p.; **3) Control de PROB:** recibió 1 μ L de PBS IHB + PROB 50 mg/kg/día x 7 días por vía i.p.; **4) Control de L-KYN:** recibió 1 μ L de PBS IHB + L-KYN 75 mg/Kg/día x 7 días por vía i.p.; **5) Control de MK-801:** recibió 1 μ L de PBS IHB + MK-801 0.8 mg/Kg/día x 7 días por vía i.p.; **6) Grupo A β + PROB:** recibió 1 μ L de A β IHB + PROB 50mg/Kg/día x 7 días por vía i.p.; **7) Grupo A β + L-KYN:** recibió 1 μ L de A β IHB + L-KYN 75mg/kg/día x 7 días por vía i.p.; **8) Grupo A β + PROB + L-KYN:** recibió 1 μ L de A β IHB + PROB (50mg/kg/día) + L-KYN (75mg/kg/día) por 7 días por vía i.p.; **9) Grupo A β + MK-801:** recibió 1 μ L de A β IHB + MK-801 0.8mg/kg/día por 7 días por vía i.p. La administración i.p. del vehículo o de los fármacos se realizó desde un día antes y hasta 6 días después de la administración hipocampal de A β (7 días totales). Las dosis empleadas de los fármacos se escogieron y se calcularon en base a publicaciones previas. Se utilizó la misma dosis de A β 25-35 que se había empleado en un trabajo previo de nuestro

grupo (Pérez-Severiano et al., 2004). Para las administraciones repetidas de L-KYN y PROB se empleó la mitad de la dosis mínima que resultó eficaz (neuroprotectora) en un estudio previo (Santamaría et al., 1996), debido a que en éste trabajo se utilizaron dosis únicas de los fármacos. Se empleó la dosis mínima de MK-801 que resultó neuroprotectora en un modelo tóxico por NMDA según lo informado por McDonald y cols. (1989). El A β 25-35 se disolvió en PBS (pH 7.4) y se almacenó en alícuotas separadas (100 μ M) y conservadas a -70°C, hasta su utilización. Con los animales bajo anestesia general usando pentobarbital sódico I.P. (50mg/Kg); el A β se administró sin ningún proceso de agregación previa, y se inyectó en el sector CA1 del hipocampo anterior de forma bilateral empleando microjeringas de 10 μ L (Hamilton) en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP: -4.2mm, ML: \pm 3.0mm, DV: 2.8mm (Paxinos & Watson, 1986). El volumen total administrado de A β o PBS intrahipocampal fue de 1 μ L (100 μ M). Este volumen se infundió lentamente a lo largo de 5 minutos para después dejar la cánula durante 2 minutos más y retirarla lentamente.

4. EVALUACION CONDUCTUAL

4. 1 Evaluación de la conducta motora espontánea en campo abierto

Con la finalidad de evaluar los efectos de los distintos tratamientos sobre la actividad motora de los individuos, y su posible repercusión en el desempeño en el laberinto acuático: los animales se evaluaron en un monitor de actividad espontánea en campo abierto (Versamax Activity Monitor, AccusScan Instruments Inc. Columbus Ohio) durante 30 minutos, en dos ocasiones: Treinta minutos después de la primera administración de cualquiera de los tratamientos administrados sistemicamente

(efectos agudos), y treinta minutos antes de la primera evaluación de memoria espacial, es decir, 7 días después de la cirugía estereotáxica (efectos subagudos).

El monitor de actividad espontánea es un dispositivo automatizado basado en sensores infrarrojos de movimiento colocados en las paredes de un cubo de acrílico transparente de 42X42 X32 cm. de altura, y del cual se obtienen de forma automática 17 parámetros cuantitativos de actividad motora espontánea organizados en bloques de tiempo predeterminados (Figura 7).

La evaluación de actividad motora espontánea se realizó en una habitación separada de aproximadamente 4 m de largo por 3 m de ancho, con las ventanas recubiertas para evitar la entrada de luz exterior y con aislamiento sonoro. Todas las evaluaciones se realizaron dentro de un rango de horario entre las 9:00 y las 13:00 hrs y con condiciones de baja iluminación artificial.

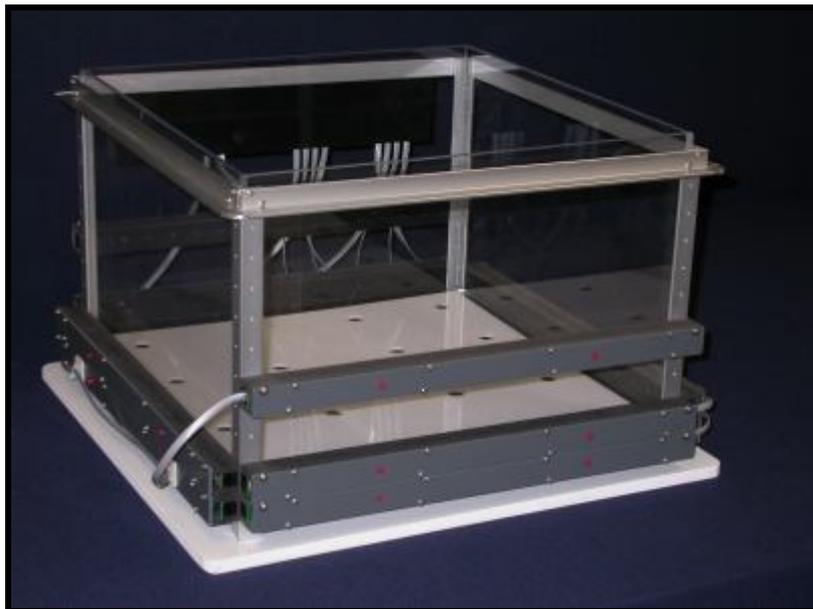


Figura 7. Fotografía de la caja de evaluación del monitor de actividad motora espontánea (Versamax Activity Monitor AccuScan Instruments)

4. 2. Evaluación de la memoria espacial de largo plazo en el laberinto acuático de Morris

Dispositivo

El laberinto consta de una piscina circular inflable de 1.80 m de diámetro, con 45 cm de altura. Dicha piscina se divide en 4 cuadrantes, en el centro de uno de los cuales se coloca una plataforma cuadrangular de acrílico transparente de 10 cm², y que mide 22 cm de altura (plataforma de escape). Para el protocolo de memoria espacial la posición de la plataforma en alguno de los cuadrantes es fija durante todo el experimento. El laberinto se llena con agua corriente a una temperatura constante entre $26 \pm 1^\circ\text{C}$, llegando a un nivel 1-2 cm por encima del nivel de la plataforma, de manera que la plataforma queda cubierta (invisible) por el nivel del agua (23-24 cm). El agua es opacada usando dióxido de titanio en polvo, y el agua es cambiada diariamente para cada prueba (Figura 8).

El dispositivo se colocó en un cuarto aislado de ruido y luz exterior, con iluminación artificial fluorescente uniforme y tenue, en donde se dispusieron tres referencias visuales en las paredes de la habitación según tres puntos cardinales, el cuarto punto cardinal de referencia está constituido por el experimentador. Todas las referencias serán visibles desde el laberinto y se mantienen fijas y constantes durante todo el experimento.

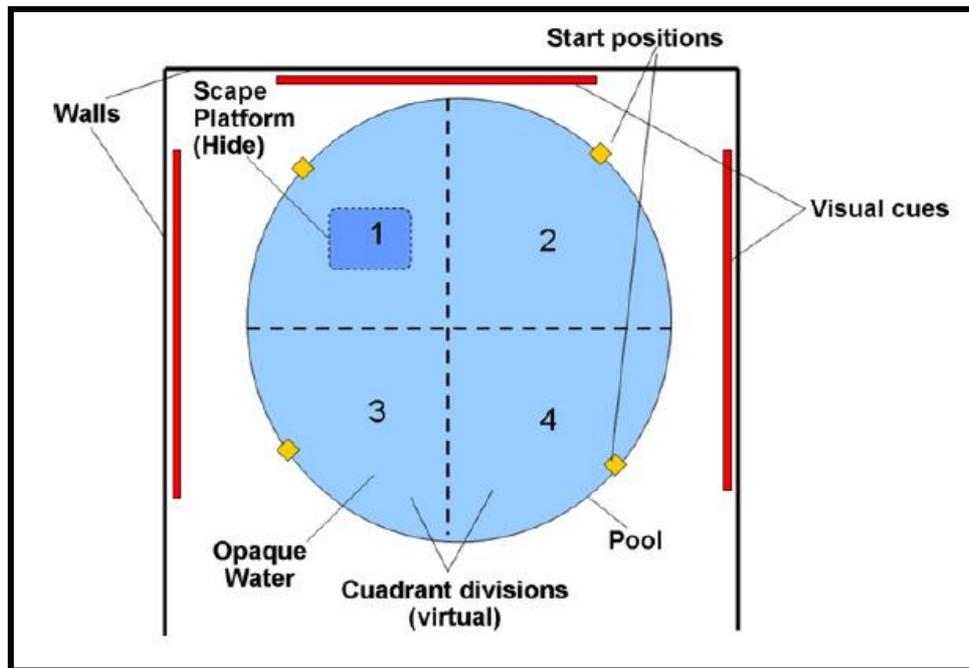


Figura 8. Diagrama esquemático del laberinto acuático de Morris (Tomado de: Carrillo-Mora et al., 2009)

PROTOCOLO DE EVALUACION

En una primera fase experimental (antes de la cirugía estereotáxica), todos los animales de experimentación fueron entrenados primero (adquisición o aprendizaje) en el laberinto acuático de Morris según el siguiente protocolo (Morris, 1981; D'Hooge & De Deyn, 2001; Carrillo-Mora et al., 2009).

SESION DE APRENDIZAJE: La sesión de adquisición de la tarea para cada animal comprendió 4 ensayos diarios durante 5 días consecutivos (sesiones), cada ensayo se realizó colocando al animal con la vista hacia alguna de las paredes de la piscina, iniciando en uno de 4 puntos posibles que coinciden con uno de los 4 cuadrantes de la piscina circular, dicha posición de inicio se asignó aleatoriamente para cada individuo. A partir de su colocación en el agua se inició la medición del tiempo de latencia hasta que el animal encontró la plataforma, momento en el que se detuvo el cronómetro y se tomó el tiempo de *latencia de escape*. Después de haber alcanzado la plataforma de escape, el animal se dejó en la plataforma durante otros 30

segundos, antes de ser removido y colocado en su jaula nuevamente hasta su nueva prueba, el tiempo máximo para completar la prueba fue de 60 segundos. Cuando el animal no encuentre la plataforma dentro de ese periodo de tiempo, se procede a colocarlo en ella manualmente durante 30 segundos en todos los ensayos, para colocarlo de nuevo en su jaula hasta el siguiente ensayo. Durante los 4 ensayos de cada sesión cada animal inició la prueba en cada uno de los 4 puntos del laberinto asignados aleatoriamente. Los resultados de las latencias de escape se obtuvieron promediando los tiempos obtenidos en los 4 ensayos diarios de cada individuo y luego promediándolo con los valores obtenidos por el resto de los individuos del grupo experimental. Después de cada ensayo los animales se colocaron en su jaula con material secante y bajo una lámpara de calor radiante y se devolvieron al bioterio hasta estar completamente secos.

SESION DE MEMORIA. Una vez terminadas las sesiones de adquisición, se evaluó la memoria 48 horas posteriores a la última sesión de adquisición, empleando para esto solo un ensayo con la posición de inicio asignada de forma aleatoria en todos los casos y con la plataforma presente y colocada en el mismo cuadrante de las sesiones de adquisición. Posterior a esta primera evaluación de la memoria se procedió a asignar aleatoriamente a los animales a alguno de los grupos experimentales para recibir los distintos tratamientos por vía sistémica y la administración estereotáxica de A β o vehículo según corresponda según se describió en el apartado de grupos experimentales.

MEMORIA ESPACIAL DE LARGO PLAZO. La memoria espacial se evaluó cada semana iniciando 7 días después de la cirugía estereotáxica durante un total de 4 semanas consecutivas. Las pruebas de memoria se realizaron mediante un solo ensayo (60 segundos), asignando previamente y de forma aleatoria la posición de

inicio. Con la plataforma presente pero invisible en la mismo cuadrante de las sesiones de adquisición.

4. 3 PROCESAMIENTO HISTOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO

Al terminar las evaluaciones conductuales (4 semanas después de la cirugía estereotáxica) los animales se anestesiaron nuevamente con pentobarbital sódico (50 mg/kg IP), y se perfundieron y fijaron por la técnica de perfusión intracardiaca con 100 ml de solución salina isotónica al 0.9% y después con 150 ml de formaldehído al 4% en PBS pH 7.4. Al terminar, el cerebro se extrajo y se mantuvo en el mismo fijador (formaldehído al 4% en PBS) durante 48-72 horas para después iniciar su proceso de deshidratación e inclusión en parafina. A partir de los bloques de parafina se obtuvieron cortes de 8-10 μm de espesor a nivel de hipocampo anterior. Se realizó tinción de Kluver-Barrera así como inmunohistoquímica para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Millipore Temecula CA. Cat: AB5804 Dilución: 1:1000) usando la técnicas reportadas con anterioridad con peroxidasa y usando diaminobencidina como revelador (Torres-Seco et al., 2002; Guembe-Echarri, 2009; Silva-Adaya et al., 2008). Se contaron las neuronas normales o degeneradas en un área lineal de 500 μm de longitud a nivel del estrato piramidal de CA1 de ambos hipocampos, a partir de un corte coronal de 8 μm de espesor en el hipocampo anterior teñido con Kluver-Barrera, de cada individuo de cada grupo, según el método descrito con anterioridad (Kiyota et al., 1991). La distancia considerada para el muestreo y obtención de los cortes de tejido hipocampal fue de entre 3.0-4.0 mm posterior a bregma. Dos cortes representativos de cada hipocampo de cada individuo de cada grupo se observaron en microscopia de luz y se consideraron para el conteo celular final. Los criterios morfológicos para la identificación de neuronas

degeneradas se basó en cambios nucleares (picnosis, cariorexis, cariolisis), cambios citoplásmicos (eosinofilia citoplásmica o pérdida de la afinidad por la hematoxilina) o edema celular con pérdida de la morfología neuronal normal según lo descrito anteriormente (Farber et al., 1981; Farber, 1982; Trump et al., 1984; García et al., 1995; Stepanichev et al., 2004). Así mismo se realizó conteo de células positivas al GFAP en la misma región de CA1 pero utilizando un campo de $500 \mu\text{m}^2$. Los criterios para considerar un astrocito reactivo fueron el incremento en la marca contra GFAP, incremento en el tamaño celular, el aumento en la longitud de sus prolongaciones, así como un incremento en la densidad y espesor de la mismas (Norton et al., 1992; Kimelberg, 2004). Todos los procedimientos de conteo celular se llevaron a cabo en ciego y fueron asesorados en todo momento por un experto en biología celular y morfología del sistema nervioso.

4. 4 ANALISIS ESTADISTICO

Los valores de la actividad motora, de la memoria espacial y morfológicos que son presentados en los resultados están expresados como valores promedio \pm E.E.M. Los valores se analizaron usando un análisis paramétrico de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey, con el software Prism 3.02 (GraphPad San Diego, CA, USA). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos. En las figuras de resultados los valores mostrados se representaron en promedio \pm E.E.M.

RESULTADOS

Evaluación de la conducta motora espontánea en campo abierto

La distancia total recorrida por los animales dentro del dispositivo medida a lo largo de 30 min no se modificó significativamente en ninguno de los grupos en relación con el grupo control, a excepción de la administración aguda de MK-801 i.p., en el cual se observó un incremento de la distancia total recorrida ($F_{(9,8)} = 6.95$, $P < 0.05$). Por otro lado la administración aguda de MK-801 i.p. también incremento la conducta estereotipada presentada por los animales ($F_{(9,80)} = 14.6$, $P < 0.001$), disminuyó la actividad vertical ($F_{(9,80)} = 4.08$, $p < 0.01$) y modificó el patrón regional de locomoción dentro del dispositivo, incrementando el tiempo total de permanencia en el centro del dispositivo y disminuyendo el tiempo de permanencia en los márgenes del mismo (Figura 9).

La actividad motora medida 30 minutos antes de la primera evaluación de memoria espacial en el laberinto acuático no demostró cambios en ninguno de los grupos. De igual forma la inyección IHB de A β no modificó el desempeño motor presentado en el monitor de actividad ni de forma aguda ni subaguda (Figura 10).

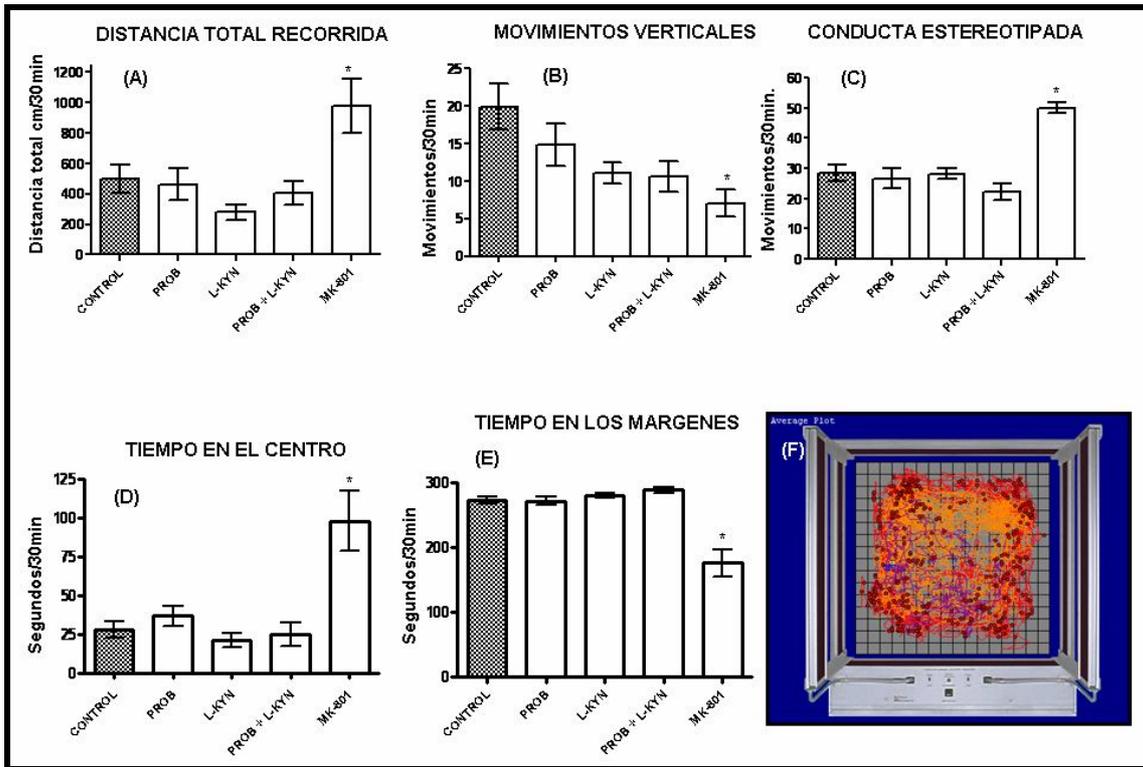


Figura 9. Efecto de la administración sistémica aguda (i.p.) de PROB (50 mg/Kg/día), L-KYN (75 mg/Kg/día), PROB + L-KYN y MK-801 (0.8 mg/Kg/día) sobre la conducta motora espontánea. La figura A representa la distancia total recorrida; (B) Número de movimientos verticales; (C) Número de movimientos estereotipados; (D) Tiempo en el centro del monitor; (E) Tiempo en los márgenes del monitor; (F) Patrón regional de movimiento dentro del monitor en el grupo de MK-801. Las evaluaciones se realizaron 30 minutos después de la administración i.p. de los fármacos durante 30 min. Las barras representan valores promedio \pm D.E. de 7-8 animales por grupo. * $p < 0.05$ diferente del control, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

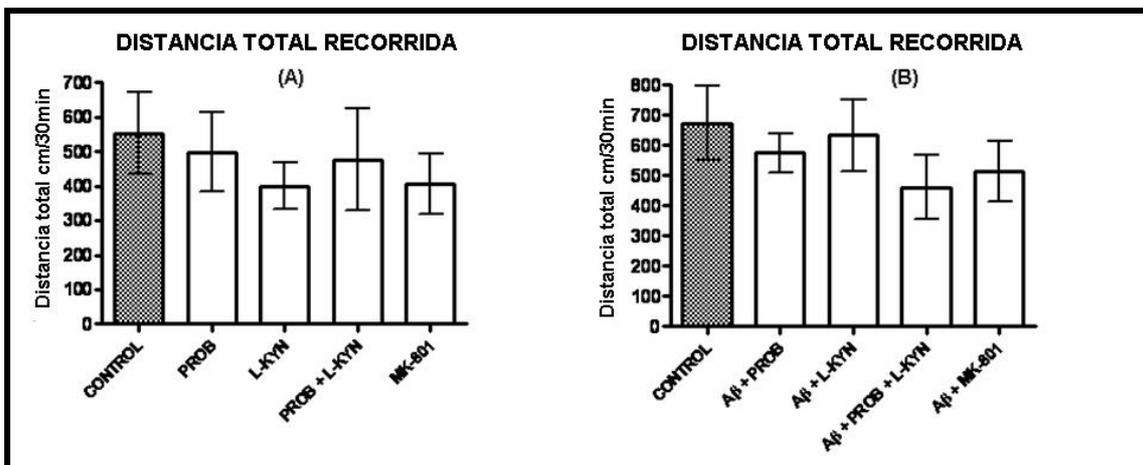


Figura 10. Efecto de la administración sistémica (i.p.) de PROB (50 mg/Kg/día), L-KYN (75 mg/Kg/día), PROB + L-KYN y MK-801 (0.8 mg/Kg/día) durante 7 días sobre la distancia total recorrida medida 30 min antes de la primera evaluación de memoria espacial en el laberinto acuático. La figura A representa los animales control de los distintos fármacos y la figura B los grupos de $A\beta$ tratados con los distintos fármacos. Las barras representan valores promedio \pm D.E. de 7-8 animales por grupo. ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Evaluación de la memoria espacial de largo plazo

La primera evaluación de memoria se realizó 48 horas después de la última sesión de adquisición en el laberinto acuático de Morris. En esta evaluación no se observó ninguna diferencia significativa entre los distintos grupos experimentales, sin embargo, fue evidente que los animales aprendieron y consolidaron la tarea espacial debido a que en todos los grupos presentaron latencias de escape promedio por debajo de los 18 segundos (Figura 11).

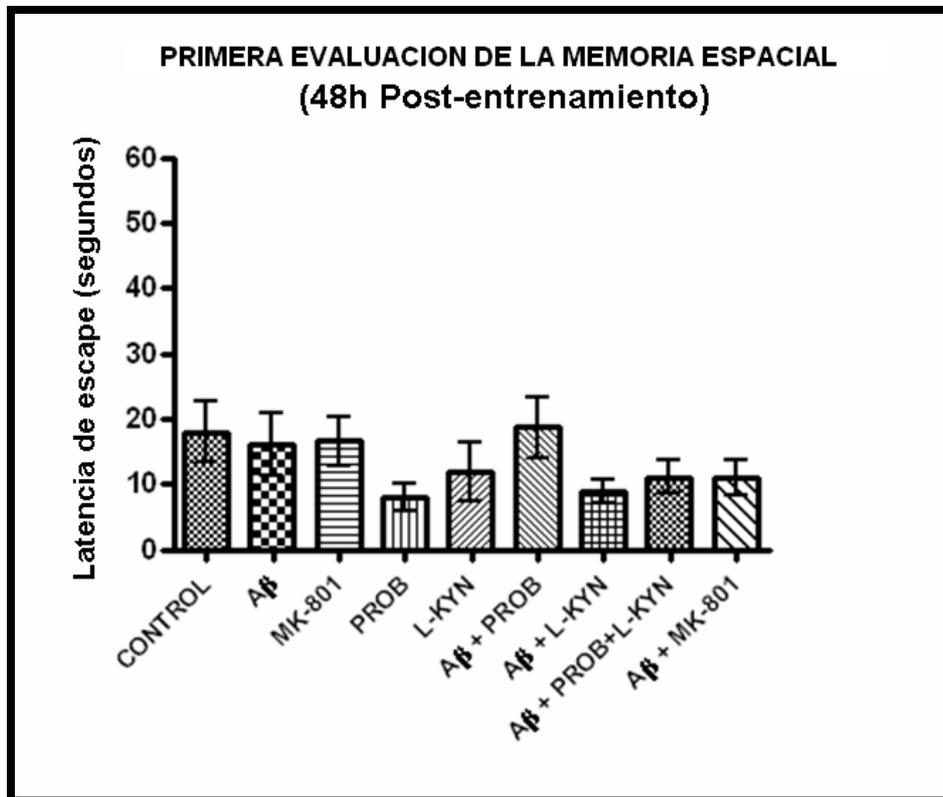


Figura 11. Primera evaluación de la memoria espacial realizada 48 horas posteriores a la última sesión de entrenamiento en todos los grupos. La evaluación se realizó antes de la asignación aleatoria de los individuos a los distintos grupos de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las latencias de escape, pero destaca que todos los grupos muestran memoria observando latencias promedio por debajo de los 18 segundos en todos los casos. Las barras representan valores promedio \pm D.E. 7-8 animales por grupo. ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Evaluación de memoria espacial de largo plazo. Durante la primera evaluación de memoria espacial realizada 7 días después de la cirugía estereotáxica se observó una gran variabilidad en las latencias promedio presentada por los distintos grupos, sin embargo, ninguna de ellas fue estadísticamente significativa (Figura 12). En la evaluación realizada a los 14 días, todos los grupos experimentales presentaron latencias promedio más homogéneas con excepción del grupo de A β , en el cual se observó una tendencia a presentar latencias más prolongadas respecto al control, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 12). A los 14 y 21 días se presentó un incremento significativo en las latencias de escape en el grupo de A β respecto del grupo control ($F_{(9,80)} = 5.24$ y $F_{(9,80)} = 4.35$, $p < 0.05$). El resto de los grupos de tratamiento continuó presentando latencias de escape bajas y homogéneas sin encontrarse diferencia respecto del control. Lo anterior sugiere que los distintos tratamientos ejercieron un efecto protector sobre los efectos conductuales deletéreos inducidos por el A β . A pesar de que no existió diferencia significativa entre los efectos protectores presentados por los distintos tratamientos podríamos tratar de agrupar los tratamientos de acuerdo a su efecto protector de mayor a menor de la siguiente manera: PROB>L-KYN>L-KYN+PROB>MK-801 (Figura 12).

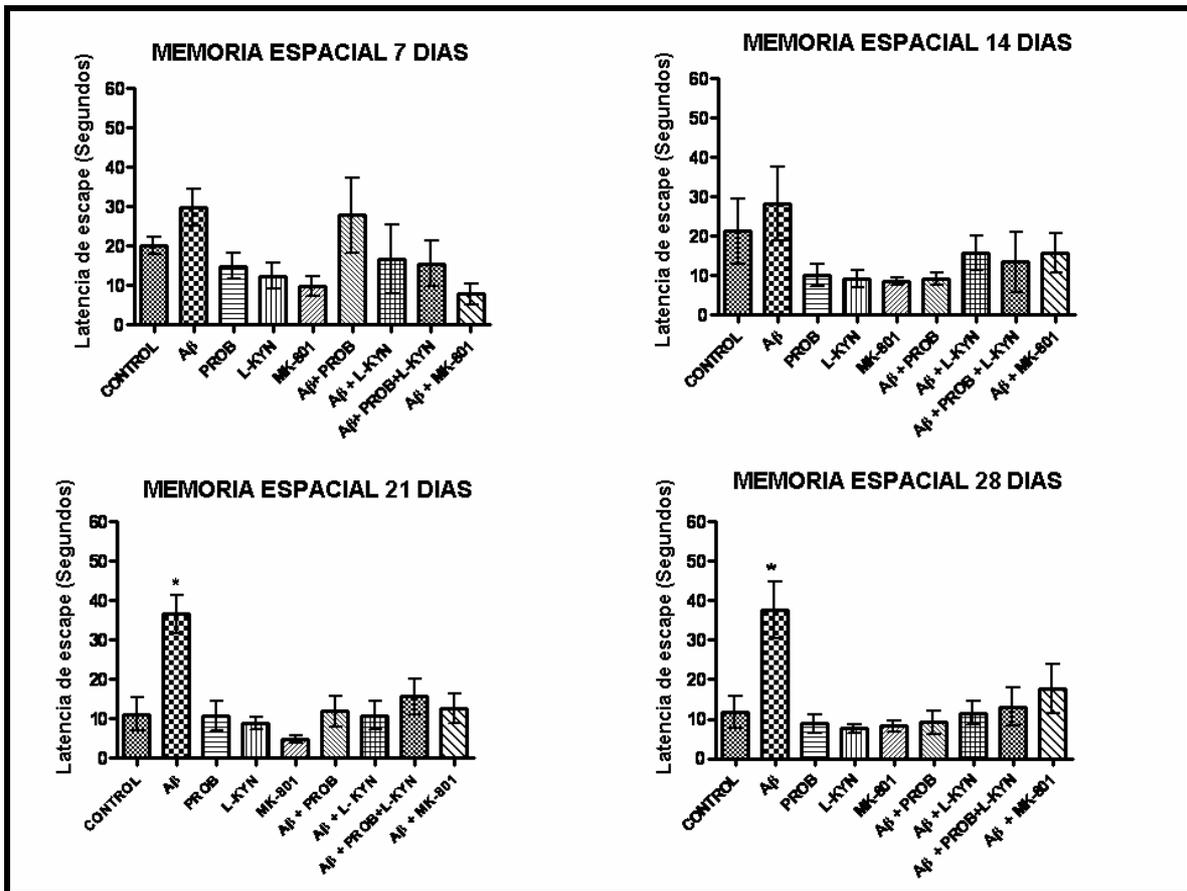


Figura 12. Efecto de la administración sistémica (i.p.) de PROB (50 mg/Kg/día), L-KYN (75 mg/Kg/día), PROB + L-KYN y MK-801 (0.8 mg/Kg/día) durante 7 días, sobre los efectos inducidos por Aβ 25-35 soluble IHB (100 μM en 1 μL) en la memoria espacial de largo plazo evaluada en el laberinto acuático de Morris. Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la cirugía estereotáxica y mediante un solo ensayo por individuo. Las barras representan valores promedio ± D.E. de 7-8 animales por grupo. *p<0.05 diferente del control. ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Tukey.

Evaluación morfológica del sector CA1 del hipocampo

Al final de las evaluaciones conductuales se realizó el procesamiento histológico de todos los cerebros de todos los grupos (28 días después de la cirugía estereotáxica). Los criterios para definir daño a nivel hipocampal incluyeron los cambios neuronales sugestivos de degeneración previamente descritos en la sección de metodología, la desorganización del estrato piramidal y el incremento de los espacios intercelulares (espacios vacíos entre las neuronas); esto visualizado por microscopía de luz a 40X. En la figura 13 se presenta un corte de bajo aumento (10X) del hipocampo, así como una magnificación (100X) con la finalidad de mostrar la zona del sector CA1 del

hipocampo que se utilizó para el análisis morfológico cualitativo y cuantitativo en todos los grupos (Figura 13).

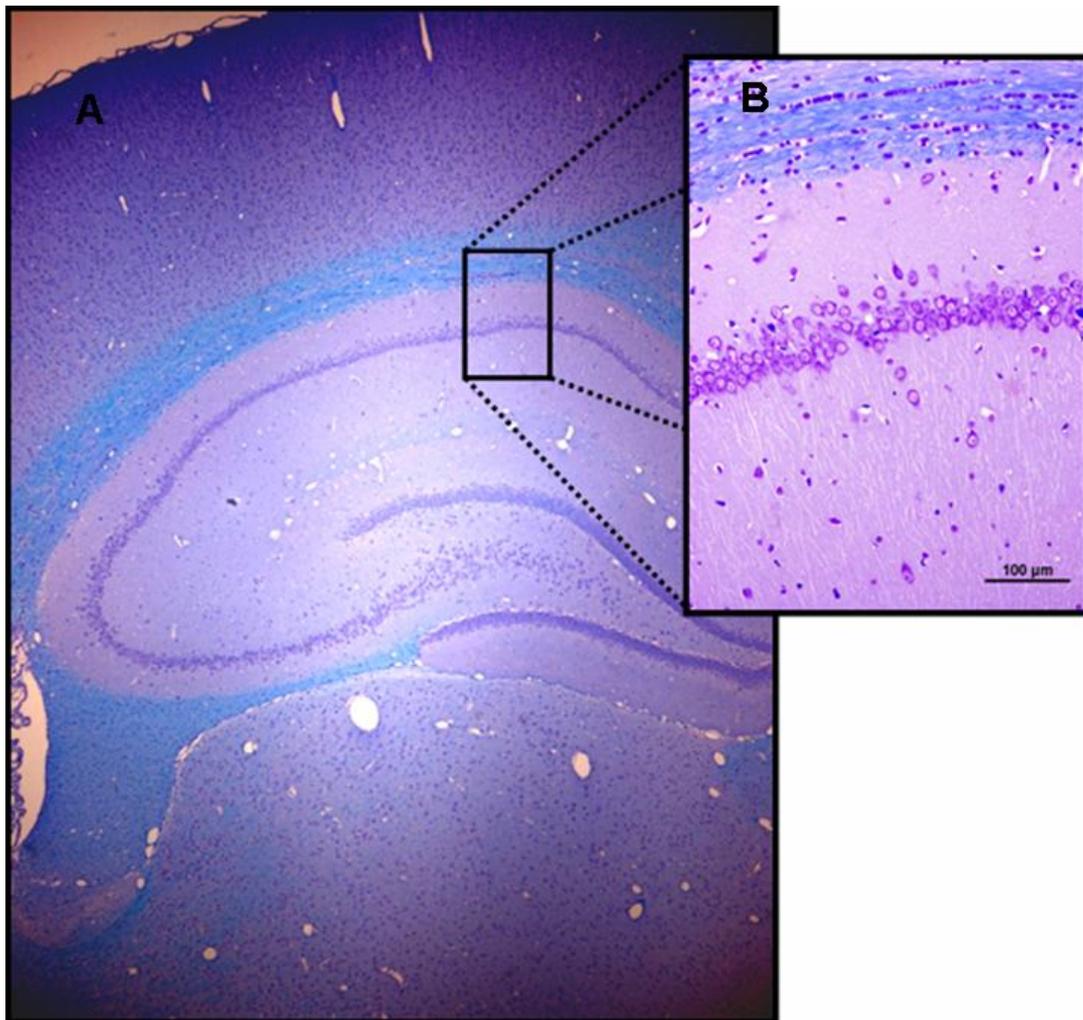


Figura 13. (A) Microfotografía de bajo aumento (10X) en la que se observa una vista panorámica del hipocampo dorsal teñido con Kluver-Barrera; (B) Acercamiento (40X) que muestra estratos celulares del sector CA1 del hipocampo dorsal que fue el sitio de interés para el análisis morfológico (solo con fines ilustrativos las fotos que se muestran pertenecen a un animal control).

El sector CA1 del grupo control no presentó ningún cambio morfológico significativo, la morfología neuronal, la estructura del estrato piramidal y el neuropilo se observaron de características normales (Figura 14-A). En contraste en el grupo de $A\beta$ se observaron alteraciones consistentes en neuronas degeneradas, desorganización del estrato piramidal, incremento de los espacios intercelulares e incluso cierta vacuolización del neuropilo (Figura 14-B). En menor medida se

observaron cambios morfológicos en otros grupos como: MK-801; A β + L-KYN; A β +PROB+L-KYN y A β + MK-801 (Figura 14 E, G, H e I respectivamente) en el resto de grupos no se observaron cambios morfológicos respecto del grupo control.

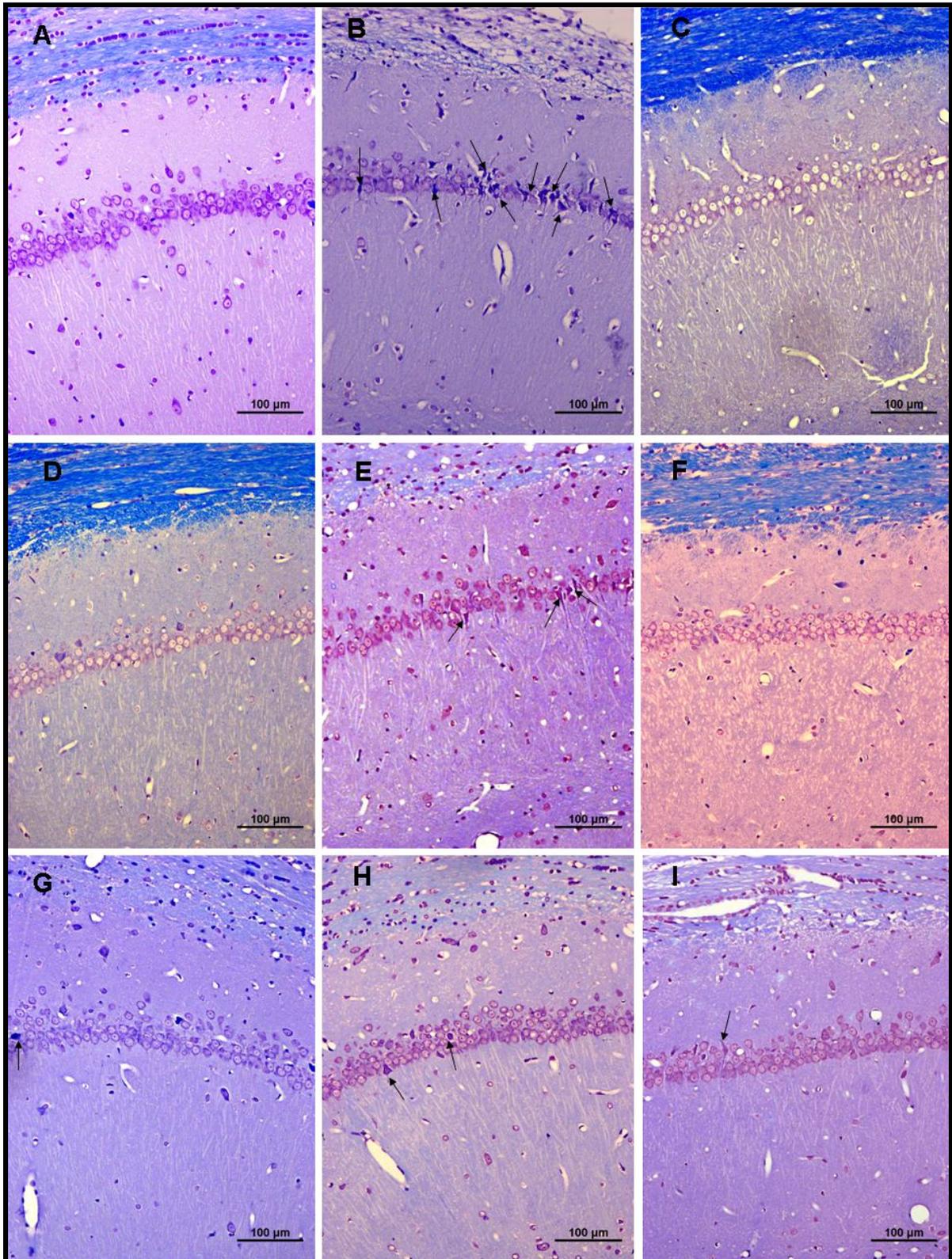


Figura 14. Cortes histológicos representativos del sector CA1 del hipocampo de los grupos: Control (A); A β 25-35 (B); PROB (C); L-KYN (D); MK-801 (E); A β +PROB (F); A β +L-KYN (G); A β +PROB+L-KYN (H) y A β +MK-801 (I). Todos los cortes se obtuvieron de 8 μ m de espesor a nivel del hipocampo dorsal (3.0 a 4.0 posterior a Bregma) y se tiñeron con Kluver-Barrera. Las flechas señalan neuronas degeneradas. La barra representa 100 μ m.

El análisis cuantitativo según el método previamente publicado por Kiyota y cols. (1991), reveló que el grupo de A β presenta una disminución significativa en el número de neuronas piramidales morfológicamente viables en comparación con el grupo control ($F_{(9,80)} = 6.93$, $P < 0.001$). Este mismo efecto se observó en el grupo de A β + L-KYN, aunque con menor significancia estadística ($F_{(9,80)} = 6.93$, $P < 0.01$). En el resto de los grupos experimentales se observó preservación del número de neuronas piramidales morfológicamente viables cuando se compararon con el grupo control (Figura 15-A). Por otra parte, al realizar el conteo de neuronas piramidales morfológicamente degeneradas se observó que el grupo de A β presentó un incremento significativo del número de neuronas degeneradas ($F_{(9,80)} = 15.99$, $p < 0.001$) y lo mismo ocurrió en el grupo de A β + MK-801 aunque con menor significancia estadística ($F_{(9,80)} = 15.99$, $p < 0.05$). El resto de los grupos no presentaron cambios en el número de neuronas degeneradas respecto del control (Figura 15-B).

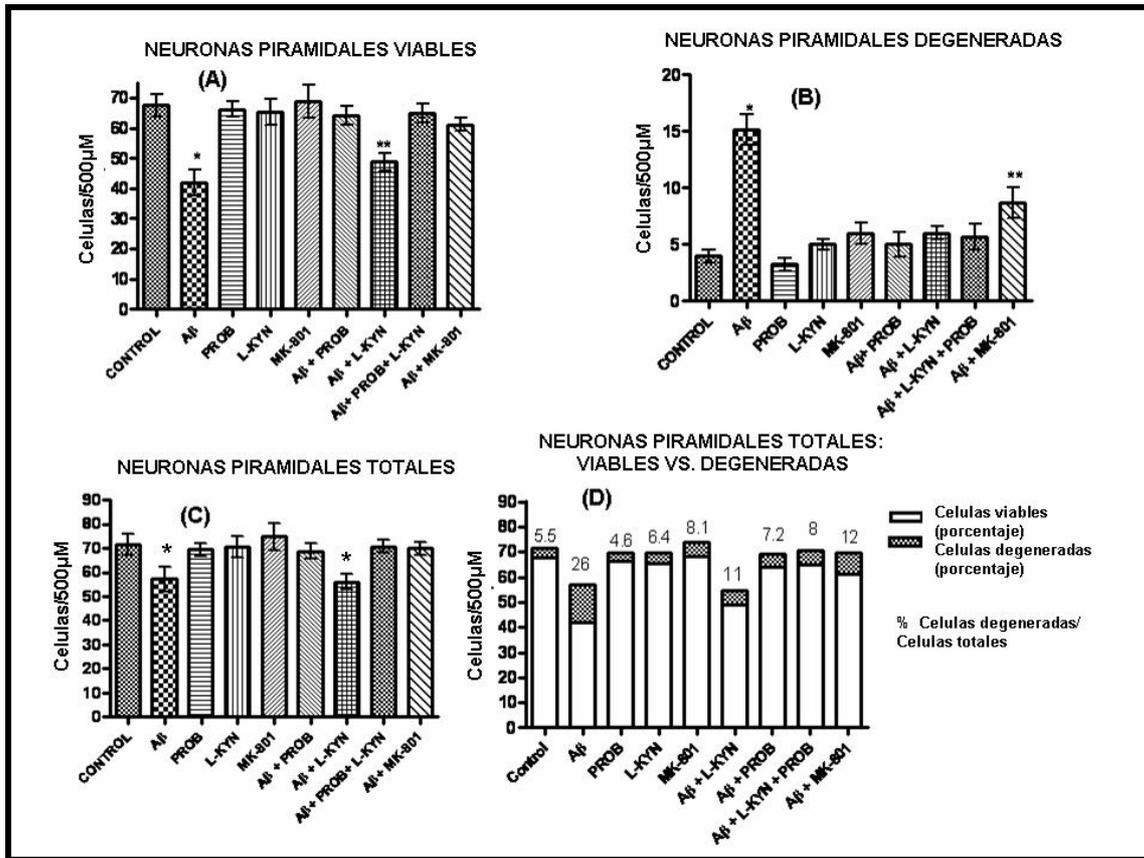


Figura 15. Análisis morfológico cuantitativo de las neuronas piramidales del sector CA1 en todos los grupos. (A) Número de neuronas morfológicamente viables; (B) Número de neuronas morfológicamente degeneradas; (C) Número de neuronas totales en el área de estudio; y (D) Representa el número de neuronas viables/degeneradas y el índice de neuronas degeneradas entre las totales. Las barras representan valores promedio \pm D.E. de 2 cortes de ambos hipocampos de cada individuo de cada grupo y de 7-8 animales por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ diferentes respecto del control. ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Finalmente el número total de neuronas piramidales observadas en el campo de estudio fue homogéneo en todos los grupos excepto en el grupo de A β y A β + L-KYN, en que se observó una disminución del número total de neuronas contenidas en CA1 respecto del control ($p < 0.05$) (Figura 15-C). Al calcular la tasa de daño neuronal que fue calculada mediante el índice de neuronas degeneradas entre las totales, se demostró un incremento de la tasa de daño neuronal en el grupo de A β respecto del control (Figura 15-D).

Evaluación inmunohistoquímica contra GFAP

Los cortes hipocampales obtenidos de las mismas regiones muestreadas para la valoración morfológica por Kluver-Barrera también fueron procesados para la evaluación de la inmunoreactividad contra GFAP, esto como indicador de gliosis reactiva a manera de marcador indirecto de toxicidad y daño neuronal (Norton et al., 1992; Kimelberg, 2004). De forma cualitativa se observó un incremento de la reactividad astrogliar al GFAP en el grupo de A β (Figura 16-A) respecto del grupo control (Figura 16-B). Dicha gliosis reactiva se observó de forma homogénea en los cinco estratos del sector CA1 del hipocampo (álveo, oriens, piramidal, radial y lacunoso) (O'Keefe & Nader, 1978), y se caracterizó por un incremento en la reactividad astrogliar al GFAP, incremento en la longitud y espesor de sus prolongaciones, así como proliferación astrogliar (Figura 16). El análisis cuantitativo de las células GFAP positivas en el campo de estudio reveló un incremento significativo de astrocitos reactivos en el grupo de A β comparado con el grupo control ($F_{(9,80)} = 16.96$, $p < 0.001$), así como una reducción de los mismos en el grupo de A β + MK-801 respecto del control ($F_{(9,80)} = 16.96$, $p < 0.05$). En el resto de los grupos no se observaron diferencias significativas en la reactividad a GFAP (Figura 17).

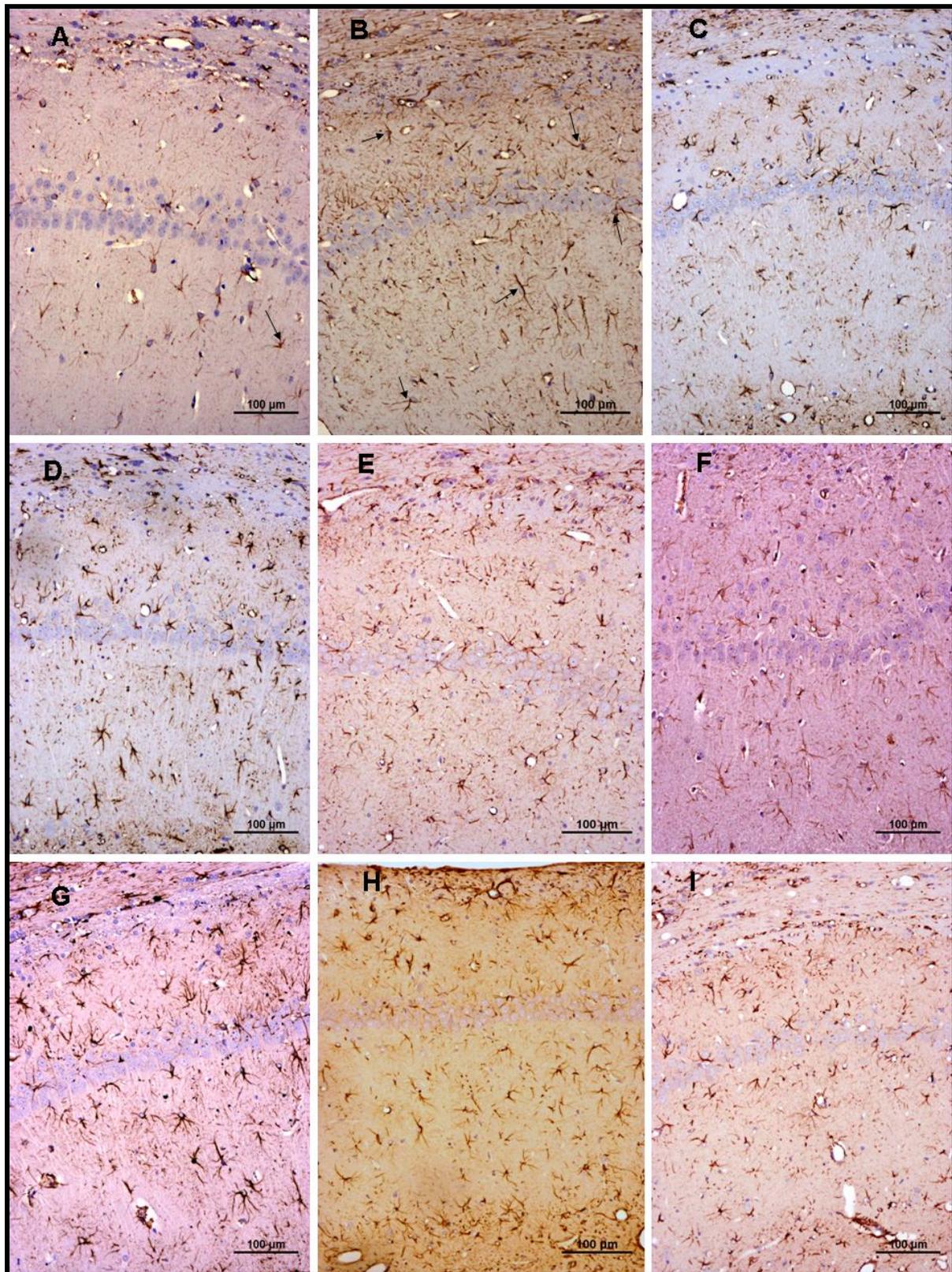


Figura 16. Cortes histológicos representativos procesados con técnica de inmunohistoquímica contra GFAP en todos los grupos: Control (A); A β 25-35 (B); PROB (C); L-KYN (D); MK-801 (E); A β +PROB (F); A β +L-KYN (G); A β +PROB+L-KYN (H) y A β +MK-801 (I). Todos los cortes se obtuvieron de 8 μ m de espesor a nivel del hipocampo dorsal (3.0 a 4.0 posterior a Bregma). Las flechas señalan células reactivas al GFAP. La barra representa 100 μ m.

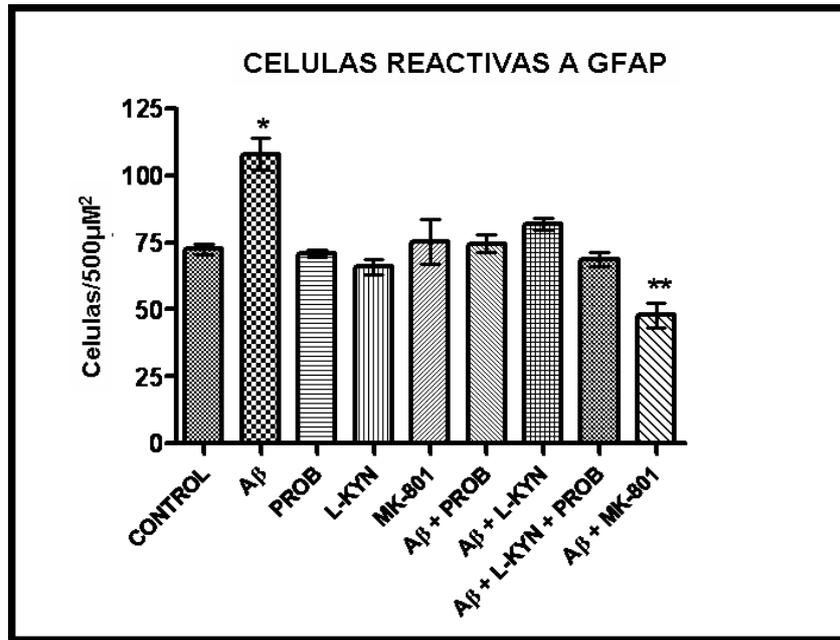


Figura 17. Se muestra el análisis cuantitativo de las células reactivas a GFAP en el sector CA1 del hipocampo en todos los grupos en un área de 500 μm^2 . Las barras representan valores promedio \pm D.E. Las barras representan valores promedio \pm D.E. de 2 cortes de ambos hipocampos de cada individuo de cada grupo y de 7-8 animales por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ diferentes respecto del control. ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

DISCUSIÓN

La hipótesis amiloidogénica continúa siendo una de las teorías más importantes y más respaldadas en la patogenia de la EA (Hardy & Allsop, 1991; Eckman & Eckman, 2007). La hipótesis amiloidogénica a pesar de haber sido propuesta hace casi 20 años continua siendo vigente debido a que esta apoyada por importantes evidencias clínicas y experimentales: 1) Los hallazgos neuropatológicos: el A β es el componente principal de las placas neuríticas, que constituyen una de las lesiones patognomónicas que se encuentran en la EA; este péptido además se encuentra en las lesiones vasculares que acompañan a la EA (angiopatía amiloide), y a la trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) (Glennner & Wong, 1984); 2) La evidencia genética derivada de los casos familiares de la EA: todas las mutaciones relacionadas al desarrollo de EA de tipo familiar (PPA, PS1, PS2) tienen como uno de sus efectos fisiopatológicos el incremento en la síntesis de A β (Ertekin-Taner, 2007); 3) Evidencia terapéutica experimental: aunque esta evidencia aún no es concluyente, las estrategias terapéuticas, tanto encaminadas a la reducción de la producción de A β , como a la remoción del mismo han demostrado mejorar algunos de los cambios patológicos de la enfermedad, sin embargo, la evidencia clínica a este respecto todavía no es concluyente (Schenk et al., 1999; Imbimbo, 2008; Town, 2009); y 4) Evidencia de toxicidad del A β : existe al momento amplia evidencia acerca de los múltiples mecanismos tóxicos que puede ejercer el A β y que pudieran explicar los cambios patológicos y degenerativos que se observan en la EA (Yankner & Lu, 2009), sin embargo, a pesar de toda esta evidencia aún no es posible establecer con certeza si el incremento en la producción de A β es el origen o de la enfermedad o solo una consecuencia patológica de cambios ocurridos con anterioridad (Atwood et al., 2003; Peña et al., 2006).

A pesar de toda esta evidencia que continua apoyando a la hipótesis amiloidea como una de las mas importantes en la etiopatogénia de la EA, existen en ella diversos “puntos débiles”, uno de ellos es la baja correlación que existe entre los depósitos de A β cerebral y el deterioro cognitivo observado en los pacientes con EA, así como los decepcionantes resultados clínicos de las estrategias terapéuticas que disminuyen su remoción o disminuyen la producción, etc. (Hardy & Selkoe, 2002; Town, 2009). A pesar de las limitantes de la hipótesis amiloidea, hoy en día continúan explorándose diversas estrategias terapéuticas encaminadas a neutralizar o contrarrestar los distintos mecanismos tóxicos presentados por el A β (Raffi et al., 2009). En este sentido uno de los mecanismos tóxicos mas relevantes que genera el A β es la sobreactivación de los receptores NMDA, produciendo excitotoxicidad y muerte neuronal (Harkany et al., 2000; Hynd et al., 2004). El uso de distintos antagonistas NMDA ha demostrado revertir los efectos deletéreos provocados por el A β a distintos niveles (conductual, bioquímico, celular, etc.), y tanto a nivel experimental como a nivel clínico incluso en las formas moderadas a severas de la enfermedad (Farlow & Cummings, 2007; Wenk et al., 2006). Sin embargo, a pesar de la amplia evidencia que existe a cerca de los efectos benéficos de los antagonistas NMDA en la EA, su uso clínico se ha visto limitado debido a que su empleo se ha relacionado con la presencia de diversos efectos colaterales que van desde alteraciones conductuales y psiquiátricas hasta conductas potencialmente adictivas en algunos casos (Carter, 1994; Lipton, 2004; Muir, 2006). Con el objetivo de disminuir o eliminar el desarrollo de estos efectos indeseables, recientemente se han desarrollado y probado distintas moléculas que actúan bloqueando el sitio co-agonista de glicina de NMDAr (Carter 1992; Leeson & Iversen, 1994). Se ha demostrado que estos fármacos poseen efectos neuroprotectores en diferentes

modelos tóxicos, con la enorme ventaja de que aparentemente no generan los efectos adversos colaterales como los observados con el uso de otros antagonistas NMDA tanto competitivos como no competitivos (Leeson & Iversen, 1994). Una de esas estrategias terapéuticas recientes es la modulación de los niveles cerebrales del KYNA; por el momento el único antagonista endógeno conocido de los NMDAr, y que ya ha sido utilizado previamente con éxito en distintos modelos tóxicos en lo que esta involucrada la sobreactivación glutamatérgica como: la isquemia, la epilepsia, la toxicidad ejercida por el QUIN y el MPTP, e incluso los efectos deletéreos inducidos por otro antagonista de los NMDAr como el MK-801 (Santamaría et al., 1996; Miranda et al., 1997; Stone, 2000; Hlinak & Krejci, 2006; Gigler et al., 2007; Robotka et al., 2008; Sas et al., 2008).

Por otro lado, como se comentó con anterioridad, existe amplia evidencia que apoya una papel importante de los metabolitos de la VK en la patogenia de la EA, tal como un incremento de los metabolitos tóxicos de la vía como el QUIN y una reducción de los niveles del KYNA (Widner et al 1999; Baran et al 1999; Guillemin et al., 2001, 2003, 2005; Hartai et al., 2007; Duleu et al., 2008; Yamada et al., 2009; Rahman et al., 2009; Gulaj et al., 2010; Duleu et al., 2010; Bonda et al., 2010). Sin embargo, la utilización de la estrategia terapéutica de modular los niveles endógenos del KYNA con el uso de PROB y L-KYN aún no había sido explorada en modelos de toxicidad por A β .

En el presente trabajo por primera vez reportamos el efecto de la modulación endógena de la VK, a través de la administración sistémica de PROB y L-KYN, sobre las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por el A β soluble en el hipocampo de rata (CA1). Los efectos de estos fármacos, ya sea solos o en combinación, como habían sido utilizados con anterioridad (Santamaría et al., 1996;

Miranda et al., 1997), se compararon con los efectos obtenidos por la administración de un antagonista no competitivo típico y potente de los NMDAr (MK-801). En este sentido es necesario considerar que se ha comprobado que todos los fármacos utilizados en este estudio (PROB, L-KYN y MK-801) tienen su acción final sobre un mecanismo común, el bloqueo de los NMDAr. Por lo tanto, asumimos que los efectos obtenidos de estos fármacos sobre los distintos parámetros evaluados se deben primariamente a sus propiedades antagónicas sobre el NMDAr (Santamaría et al., 1996; Stone, 2000; Stone, 2001; Schwarcz & Pellicciari, 2002). Sin embargo, es importante considerar que aunque el mecanismo final de estos fármacos es el mismo, cada uno de ellos puede presentar efectos diferenciales debido a que producen el bloqueo del NMDAr de distintas maneras (MK-801: bloqueando directamente el poro del canal del NMDAr; mientras que el KYNA cerebral inducido por el PROB y L-KYN, ejerce su acción uniéndose al sitio glicina B del NMDAr).

PARÁMETROS CONDUCTUALES

Conducta motora espontánea en campo abierto

Los efectos conductuales ejercidos por los fármacos utilizados primero se evaluaron estimando la actividad motora espontánea en campo abierto de los animales de experimentación de los distintos grupos bajo dos condiciones de tratamiento, una aguda y otra subaguda. La finalidad de la evaluación motora en estas dos condiciones es doble, por un lado comparar los efectos motores (considerados como indeseables) ejercidos por el PROB y/o L-KYN con los efectos inducidos por el MK-801, y por otro lado evidenciar si estos fármacos ejercen efectos tales sobre la motricidad que afecten el desempeño de los animales en el laberinto acuático de Morris.

En este trabajo se demostró que de entre los fármacos utilizados, solo el MK-801 afectó significativamente la conducta motora. La administración sistémica aguda de MK-801 (0.8 mg/Kg) produjo un incremento de la distancia total recorrida dentro del dispositivo al compararlo con los controles, además de una disminución de la actividad exploratoria vertical y el "rearing", así como un incremento de la actividad estereotipada, y una alteración del patrón regional de locomoción dentro del dispositivo, incrementándose el tiempo que el animal pasa en el centro del dispositivo y disminuyendo en la periferia. Todas estas alteraciones de la motricidad están ampliamente documentadas en la bibliografía (Irifune et al., 1995), y se han observado incluso con dosis menores a las utilizadas en este estudio. En este sentido, algunos autores han sugerido que la dosis umbral a partir de la cual se presentan dichos efectos motores es tan baja como 0.2 mg/Kg, a dosis menores el MK-801 aparentemente no tiene efectos sobre la actividad motora ni el aprendizaje espacial (Ford et al., 1989; Wozniack et al., 1990; Irifune et al., 1995). La dosis empleada de MK-801 en este trabajo se basó en un estudio previo en el que se demostró que ésta dosis fue la mínima a la cual el MK-801 resultó completamente neuroprotector en un modelo tóxico inducido por NMDA (McDonald et al., 1989).

Por otra parte, la administración sistémica aguda de PROB y PROB + L-KYN, provocó solo una ligera tendencia a disminuir la actividad exploratoria vertical en los animales de experimentación, a pesar de que en el caso de la L-KYN esta tendencia llegó a ser significativa, el resto de los parámetros motores no se alteraron. Estos hallazgos en los parámetros motores coinciden con lo reportado con anterioridad por Vécsei & Beal (1990); quienes provocaron una reducción significativa de la actividad vertical después de la administración intraventricular de dos dosis distintas de L-KYN. En este mismo estudio al administrar KYNA por la misma vía, los autores

encontraron una reducción significativa de la actividad locomotora y la actividad vertical, así como un incremento en la actividad estereotipada y el desarrollo de ataxia. Es interesante destacar que en este estudio, con excepción de la actividad vertical, la L-KYN no modificó significativamente ningún otro parámetro de motricidad (Vécsei & Beal, 1990). Esta discrepancia entre los efectos provocados por la administración directa de KYNA y la administración de sus precursores metabólicos como la L-KYN, se han relacionado principalmente con la velocidad con la que ocurre el metabolismo de la L-KYN en la VK, aunque también podría deberse a una biotransformación selectiva de la L-KYN a KYNA en las regiones cerebrales en donde éste último sea necesario para la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica o colinérgica. Siguiendo este razonamiento, la administración cerebral directa del KYNA podría ejercer sus efectos inhibitorios de una manera directa, inespecífica y poco regulada, lo cual puede estar relacionado con los efectos que se han observado sobre la actividad motora. En apoyo a esta teoría, en otro estudio previo se informó que la administración sistémica de L-KYN (100 mg/Kg) no provocó ningún efecto sobre la distancia total recorrida en ratas (Chess et al., 2007). En nuestro estudio las evaluaciones conductuales motoras se realizaron muy cerca del tiempo al que se ha informado que ocurre el pico máximo de las concentraciones de KYNA cerebral después de la administración sistémica de L-KYN (alrededor de 1.5 horas) (Vécsei & Beal, 1990; Miller et al., 1992), por lo que consideramos que representan adecuadamente los efectos motores agudos de PROB y/o L-KYN. Aunque en los estudios antes citados, las determinaciones de KYNA cerebral en respuesta a la administración sistémica de L-KYN se han realizado en el cuerpo estriado, existen informes previos que han demostrado que la producción de KYNA en respuesta a L-KYN en otras regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza

piriforme del lóbulo temporal, tienen el mismo comportamiento que en el estriado, lo cual puede deberse a la distribución relativamente homogénea de las KATs en las distintas regiones cerebrales que son las principales enzimas responsables de la síntesis de KYNA cerebral (Speciale et al., 1990; Wu et al., 1992).

Por otra parte, es importante señalar que no se observaron alteraciones motoras en la evaluación motora subaguda con ninguno de los fármacos administrados, esta evaluación se realizó 30 minutos antes de la primera evaluación de memoria espacial en el laberinto acuático. Por lo anterior nuestros resultados indican que en nuestro estudio la administración de los distintos tratamientos durante 7 días no afectó la actividad motora de forma subaguda y por lo tanto no alteró el rendimiento presentado por los animales en el laberinto acuático. Finalmente, no se observaron cambios en la actividad motora provocados por la administración IHB del A β 25-35 soluble, tanto cuando fue administrado de forma aislada como en combinación con cualquiera de los fármacos estudiados, por lo que se descarta al A β como una fuente de variabilidad en los parámetros motores.

Memoria espacial de largo plazo

Al respecto de las evaluaciones de la memoria espacial, en nuestro estudio observamos que la administración intrahipocampal bilateral de A β 25-35 soluble en el sector CA1, provocó alteraciones progresivas de la memoria espacial, y dichos cambios se vuelven significativos a partir del día 21 posterior a la administración IHB de A β . Este efecto del A β sobre la memoria se ha descrito con anterioridad por Holscher y cols. (2007). En dicho estudio la administración intracerebroventricular de A β 25-35 soluble (10 nM por 3 días) provocó alteraciones de la memoria espacial evaluadas en el laberinto radial entre los días 12-20 posteriores a la administración

(Holscher et al., 2007). Por otra parte, estos resultados concuerdan también con los efectos deletéreos descritos en otros estudios, en los que se ha observado que el deterioro sobre la memoria y el aprendizaje espacial inducidos por el A β 25-35 pueden presentarse después de períodos tan largos como 10 semanas posteriores a la administración (Chen et al., 1996; Tohda et al., 2003; Stepanichev et al., 2004).

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la manipulación farmacológica de la VK utilizando PROB y L-KYN, solos o en combinación, durante 7 días, es capaz de proteger significativamente de los efectos deletéreos sobre la memoria inducidos por el A β durante un periodo de tiempo de al menos 4 semanas. A pesar de las discretas diferencias observadas en los tiempos de latencia de escape en los distintos grupos de tratamiento, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los mismos, lo cual sugiere que los distintos tratamientos ejercieron una protección de similar magnitud en lo que a memoria espacial se refiere. Es interesante señalar que el grupo de PROB presentó una tendencia a inducir mayor protección en cuanto a memoria espacial en relación con el resto de los grupos de tratamiento, incluyendo el grupo de administración combinada de PROB y L-KYN. A pesar de que esto último contrasta con lo informado en otros estudios farmacológicos en los que la administración simultánea de ambos fármacos tiene efectos sinérgicos produciendo comparativamente incrementos superiores del KYNA cerebral que la obtenida al emplear los fármacos por separado (Miller et al., 1992). Es importante considerar que este estudio no es del todo comparable con el nuestro debido a que los autores del citado estudio emplearon dosis únicas de los fármacos, mientras que en nuestro estudio utilizamos una administración subcrónica de los mismos, por lo que es esperable obtener resultados diferentes. Por otro lado, también sugerimos que los efectos protectores

presentados por el PROB, pueden estar mediados no solo por su acción sobre los niveles cerebrales de KYNA, sino además por otros mecanismos adicionales. En este sentido, es ampliamente conocido que el PROB es un inhibidor inespecífico del transporte de ácidos orgánicos a través de distintas barreras epiteliales, lo cual podría provocar cambios en el pH del microambiente celular provocando a su vez una modulación agregada aunque inespecífica del los NMDAr y otros receptores, esto debido a que está bien descrita la capacidad de modulación del NMDA en relación a los cambios del pH tanto intra como extracelular (Chen et al., 1998). Otro posible mecanismo de acción del PROB puede estar en relación con su efecto sobre la acumulación y excreción de otros mediadores neuroprotectores o antiinflamatorios en el tejido cerebral (Gamache et al., 1986; Hesselink et al., 1999). Además recientemente se ha demostrado que el PROB es capaz de inhibir eficaz y selectivamente los canales/receptores de pannexina-1 (P2X₇), que están involucrados en la salida celular de ATP y la activación del inflamosoma para la liberación de IL1 β ; por lo cual el PROB pudiera tener efectos anti-inflamatorios (Silverman et al., 2008). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los efectos protectores presentados por los distintos tratamientos, estos mecanismos de acción del PROB resultan por el momento meramente especulativos, y deberán realizarse estudios posteriores para poder descartarlos o comprobarlos.

Por otro lado, los efectos negativos de todos los antagonistas NMDA sobre los eventos fisiológicos de plasticidad sináptica, como el aprendizaje y la memoria, se conocen desde hace mucho tiempo. Sin embargo, estos efectos negativos han sido mas consistentemente observados sobre la adquisición, es decir el aprendizaje, que sobre la memoria (Ahlander et al., 1999). En este sentido se ha demostrado que los

antagonistas NMDA como el KYNA pueden incluso revertir las alteraciones motoras y de memoria generadas por otro antagonista NMDA como el MK-801 (Hlinak & Krejci, 2006). Así mismo, se ha demostrado que otros antagonistas NMDA no competitivos como la memantina y el neramexane mejoran el desempeño en tareas de memoria espacial cuando son administrados en individuos sanos (Mondadori et al., 1989; Lederer et al., 1993; Zoladz et al., 2006; Parsons et al., 2007). La razón para estos efectos diferenciales de los antagonistas NMDA puede deberse, entre otras cosas al sitio de acción específico de cada fármaco, por lo que pueden ejercer modulaciones diferentes del receptor, pero además a que actúen sobre poblaciones diferentes de receptores (subunidades), y sobre receptores con distintos estados de activación previa, lo cual puede a su vez modular la afinidad con la que se unen los distintos antagonistas al NMDAr (Kemp & McKernan, 2002; Fatokun et al., 2008).

Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos.

Los cambios celulares inducidos por el A β 25-35 soluble sobre el sector CA1 del hipocampo incluyeron: la desorganización del estrato piramidal, con incremento en los espacios intercelulares y la presencia de picnosis, cariorréxis y cariolísis neuronal, así como eosinofilia citoplásmica. En términos cuantitativos estas modificaciones estuvieron representadas por una reducción en el número de neuronas morfológicamente viables, con un incremento en el número de neuronas morfológicamente degeneradas. Estos hallazgos concuerdan con los efectos morfológicos descritos con anterioridad para la administración I.C.V. de A β 25-35 (Stepanichev et al., 2004). Respecto de los diferentes grupos de tratamiento, con excepción del grupo de A β + L-KYN, todos los demás tratamientos empleados preservaron de forma homogénea el número de neuronas viables. Estos datos

morfológicos, concuerdan con los datos obtenidos del estudio de la memoria espacial, en los cuales se observó que el menor nivel de preservación de la memoria espacial también ocurrió en el grupo de A β + L-KYN. De forma similar aunque en menor medida, en el grupo de A β + MK-801 se observó un incremento relativo del número de neuronas degeneradas comparado con el grupo control. Por otra parte, únicamente en los grupos de A β y A β + L-KYN se observó una reducción del número total de neuronas contenidas en el área de análisis del sector CA1.

Los estudios de inmunohistoquímica contra GFAP se demostró que todos los tratamientos aquí utilizados fueron capaces de atenuar significativamente la activación astrogliar de una manera similar, siendo solo el grupo de A β + MK-801 en donde se demostró una reducción mas significativa de la astrogliosis reactiva en relación al control, lo cual también se correlaciona con lo observado en el análisis histológico. El hallazgo de reducción de atrogliosis en todos los grupos de tratamiento puede interpretarse como secundario al menor daño inflingido hacia el tejido neuronal, y no a un efecto directo de las distintos fármacos sobre la activación atrogliar. Aunque esto último no puede descartarse por completo, pues como se comentó con anterioridad, para el PROB se han descrito algunos mecanismos anti-inflamatorios, que podrían a su vez disminuir la activación astrogliar mediada por la inflamación, que está demostrado que puede inducir el A β (Rosales-Corral et al., 2004; Silverman et al., 2008).

Finalmente a pesar de los hallazgos histológicos significativos, cabe destacar que no se observaron efectos de pérdida neuronal muy severos por la administración de A β , y a pesar de ello sí se observaron efectos conductuales sobre la memoria espacial muy significativos, la explicación a esta discrepancia puede radicar en que se ha establecido que los efectos deletéreos mas importantes y mas precoces ejercidos

por el A β en las neuronas (sobretudo cuando es administrado en estado soluble), ocurren sobre la función sináptica, sin involucrar necesariamente procesos de daño o muerte neuronal (Selkoe, 2002; Holscher et al., 2007; Parameshwaran et al., 2008; Moreno et al., 2009), aspecto que no fue abordado en esta investigación, por lo que evaluar la función sináptica en estudios posteriores resultará muy importante y enriquecedor.

CONCLUSIONES:

A pesar de que los resultados obtenidos en el presente trabajo nos son suficientes para sugerir con precisión cual es el mecanismo mediante el cual los distintos fármacos empleados ejercen su efecto neuroprotector, podemos asumir que dichos efectos son primariamente provocados por la modulación de la activación del NMDAR generada por el A β 25-35, previniendo así los efectos de excitotoxicidad como se ha reportado con anterioridad al utilizar KYNA en rebanadas hipocampales provenientes de ratones transgénicos APP695SWE (Fitzjohn et al., 2001). Sin embargo, otros posibles mecanismos de acción del KYNA no pueden descartarse, ya que como se ha demostrado previamente el KYNA puede además inhibir los receptores α -7 nicotínicos (Alkondon et al., 2004), se ha demostrado recientemente que este receptor tiene un papel relevante en la regulación de la liberación de glutamato en la corteza cerebral (Konradsson-Geuken et al., 2010), y por otro lado tiene un papel muy importante en la internalización y la toxicidad celular presentada por el A β sobre las neuronas colinérgicas (Nagele et al., 2002; Pakaski & Kalman, 2008). Por lo cual la modulación de estos receptores nicotínicos a través del incremento del KYNA cerebral puede prevenir la internalización y la toxicidad del A β reduciendo así el deterioro cognitivo. También se ha demostrado en estudios *in vitro*, que a concentraciones elevadas, el KYNA puede interactuar con receptores AMPA,

glicina A, receptores glutamatérgicos metabotrópicos e incluso con receptores GABA_A, modulando la acción de todos ellos (Mok et al., 2009) Sin embargo, la significancia fisiológica *in vivo* de estas interacciones se desconoce debido a que las concentraciones empleadas en estos estudios son muy superiores a las fisiológicas e incluso a las observadas en eventos patológicos. Finalmente es importante mencionar que también en estudios *in vitro* se ha demostrado que el KYNA puede tener propiedades antioxidantes directas sobre algunos radicales libres como el superóxido e incluso el hidroxilo (Poeggeler et al., 1996; Goda et al., 1999). Nuevamente, si el KYNA ejerce o no un efecto antioxidante *in vivo* sobre los efectos inducidos por el A β , es un aspecto que deberá estudiarse posteriormente, en estudios encaminados específicamente para ese fin. Por el momento los efectos neuroprotectores obtenidos por la modulación farmacológica de la VK, empleando PROB y L-KYN, sobre los parámetros conductuales y morfológicos en el sector CA1 del hipocampo, representan una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento de otros desórdenes neurodegenerativos que presenten un importante componente excitotóxico.

PERSPECTIVAS.

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio se plantean diversas perspectivas interesantes para el estudio futuro. Por un lado, resulta importante establecer los efectos de distintas dosis de los fármacos aquí empleados, así como modificar los tiempos de administración para establecer si existe un rango de dosis eficaz y una ventana temporal terapéutica para el efecto neuroprotector mostrado. Por otro lado, es muy importante establecer el mecanismo de acción mediante el cual los fármacos aquí utilizados se encuentran ejerciendo su papel neuroprotector,

que como se discutió con anterioridad, pueden ir más allá del incremento en las concentraciones de KYNA cerebral. Además, será importante estudiar en este modelo distintos marcadores de funcionalidad o plasticidad sináptica, ya que se ha establecido que los efectos más importantes del A β ocurren a nivel de esta función, lo cual pudiera tener una correlación muy estrecha con el deterioro mostrado con la administración de A β y con la recuperación de la memoria observada con los distintos grupos tratamiento. Paralelamente, el estudio a cerca de otras propiedades benéficas del KYNA, como son su posible papel como antioxidante, deberán ser replicadas tanto en preparaciones biológicas *in vitro* como en estudios *in vivo*. Finalmente resultará interesante conocer si la modulación de los NMDAr a través del KYNA o el KYNA en si mismo puede afectar de alguna forma la producción o agregación del A β tanto *in vitro* como *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ahlander M, Misane I, Schott PA, Ogren SO (1999). A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (Dizocilpine) in the rat. *Neuropsychopharmacol*, 21:414-426.
2. Alkondon M, Pereira EFR, Yu P, Arruda EZ, Almeida LEF, Guidetti P, et al. (2004). Targeted deletion of the kynurenine aminotransferase II gene reveals a critical role of endogenous kynurenic acid in the regulation of synaptic transmission via $\alpha 7$ nicotinic receptors in the hippocampus. *J Neurosci*, 24: 4635-4648.
3. Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, et al. (2003). Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid β . *Brain Res Rev*, 43: 1-16.
4. Baran H, Jellinger H, Deecke L. (1999). Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 106: 165-181.
5. Beadle G W, Mitchell H K, Nyc J F. (1947). Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophan in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 33: 155-158.
6. Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D. (1994). Amyloid β peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res*, 645: 253-264.
7. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, Meier-Ruge W, Ulrich J. (1990). Morphological adaptive response of the synaptic junctional zones in the human dentate gyrus during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res*, 517; 69-75.
8. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Paoloni R, Caselli U, Galeazzi L, Meier-Ruge W. (1996). Synaptic structural dynamics and aging. *Gerontology*, 42: 170-180.

9. Bhattacharyya MK & Kumar N. (2001) Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. *Int J Parasitol*, 31: 1129-1133.
10. Bloom BS & Straus WL. (2003). Cost of illness of Alzheimer's disease: How useful are current estimates? *Gerontologist*, 43: 158-164.
11. Bonda D, Mailankot M, Stone J, Garret M, Staniszewska M, Castellani R, et al. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep*, 15: 161-168.
12. Boyland E & Williams DC. (1956). The Metabolism of tryptophan in patients suffering from cancer of the bladder. *Biochem J*, 64:578-582.
13. Braak H & Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82: 239-259.
14. Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, Marcuccilli CJ, Chisholm JC, Miller RJ. (1995). The Ca²⁺ influx induced by β -amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiology*, 26: 325-338.
15. Brown BR & Price JM. (1956). Quantitative studies of metabolites of tryptophan in the urine of the dog, cat, rat and man. *J Biol Chem*, 219: 985-997.
16. Butler AW, Mandy YM, Hamshere ML, Forabosco P, Wroe R, Ammar-Al-Chalabi, et al. (2009). Meta-analysis of linkage studies of Alzheimer's Disease- A web resource. *Neurobiol Aging*, 30: 1037-1047.
17. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. (2007). Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Rad Biol Med*, 43: 658-677.

18. Café C, Torri C, Bertorelli L, Angeretti N, Lucca E, Forloni G., et al. (1996). Oxidative stress after acute and chronic application of β -amyloid fragment 25-35 in cortical cultures. *Neurosci Lett*, 203:61-65
19. Canevari L, Clark JB, Bates TE. (1999). β -amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Letters*, 457: 131-134.
20. Carla V, Lombardi G, Beni G, Russi P, Moneti G, Moroni F. (1988). Identification and measurement of kynurenic acid in the rat brain and other organs. *Anal Biochem*, 169: 89-94.
21. Carpenedo R, Chiarugi A, Russi P, Lombardi G, Carla V, Pellicciari R, et al. (1994). Inhibitors of kynurenine hidroxilase and kynureninasa increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience*, 61:237-244.
22. Carrillo-Mora P, Giordano M, Santamaría A. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res*, 203:151-164.
23. Carter AJ. (1994). Many agents that antagonize the NMDA receptor-channel complex in vivo also cause disturbance of motor coordination. *J Phramacol Exp Ther*, 269: 573-580.
24. Carter A J. (1992). Glycine antagonists: Regulation of the NMDA receptor-channel complex by the strychnine-insensitive glycine site. *Drugs Future*, 17: 595-613.
25. Cerpa W, Dinamarca MC, Inestrosa NC. (2008). Structure-function implications in Alzheimer's disease: Effect of A β oligomers at central synapses. *Curr Alzh Res*, 5:233-243.

26. Chapman PF, Falinska AM, Knevetz SG, Ramsay MF. (2001). Genes, models and Alzheimer's disease. *Trend Gen*, 17: 254-261.
27. Chen SY, Wright JW, Barnes CD. (1996). The neurochemical and behavioural effects of β -amyloid peptide (25-25). *Brain Res*, 720: 54-60.
28. Chen YH, Wu ML, Fu WM. (1998). Regulation of presynaptic NMDA responses by external and intracellular pH changes at developing neuromuscular synapses. *J Neurosci*, 18:2982-2990.
29. Chess AC, Landers AM, Bucci DJ. (2009). L-kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behav Brain Res*, 201: 325-331.
30. Chess AC, Simoni MK, Alling TE, Bucci DJ. (2007). Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophrenia Bull*, 33:797-804.
31. Cleary J, Hittner JM, Semotuk M, Mantyh P, O'Hare E. (1995). Beta-amyloid (1–40) effects on behavior and memory. *Brain Res*, 682:69-74.
32. Clementi ME, Marini S, Coletta M, Orsini F, Giardina B, Misiti F. (2005). A β (31–35) and A β (25–35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. *FEBS Lett*, 579: 2913-2918.
33. Constantino G. (2009). New promises for manipulation of kynurenine pathway in cancer and neurological disease. *Exp Op Ther Targets*, 13:247-258.
34. Cowburn R F, Wiehager B, Trief E, Li-Li M, Sundstorm E. (1997). Effects on beta amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino-acid receptors and voltage-dependent calcium channels. Evidence for a selective

- affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptors. *Neurochem Res*, 22: 1437-1442.
35. Cummings JL. (2004). Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 351: 56-67.
36. D'Hooge R & De Deyn PP. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev*, 36: 60-90.
37. Delobette S, Privat A, Maurice T. (1997). In vitro aggregation facilitates β -amyloid peptide- 25–35 –induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol*, 319: 1-4.
38. Drachman DA. (2006). Aging of the brain, entropy and Alzheimer disease. *Neurology*, 67: 1340-1352.
39. Duleu S, Mangas A, Poullietier de Gannes F, Tranchant MC, Geffard M. (2008). Circulating antibodies to conjugated tryptophan derivatives of the IDO pathway in amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's, Parkinson's and multiple sclerosis patients. *Immuno-Analyses & Biologie Spécialisée*, 23: 27–34.
40. Duleu S, Mangas A, Sevin F, Veyret B, Bessede A, Geffard M. (2010). Circulating antibodies to IDO/THO pathway metabolites in Alzheimer's Disease. *Int J Alz Dis*, 15: 501-541.
41. Eckman CB & Eckman EA. (2007). An update on amyloid hypothesis. *Neurol Clin*, 25:669-682.
42. Ellinger A. (1904). Die entstehung der kynurensaure. *Z Physiol Chem*, 43: 325-337.
43. Ertekin-Taner N. (2007). Genetics of Alzheimer's Disease. A centennial Review. *Neurol Clin*, 25: 611-667.
44. Farber JL, Chien KR, Mitnacht Jr S. (1981). The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol*, 102:271–81.

45. Farber JL. (1982). Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulation necrosis. *Lab Invest*, 47:114–23.
46. Farlow MR & Cumming JL. (2007). Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. *Am J Med*, 120: 388-397.
47. Fatokun AA, Smith RA, Stone TW. (2008). Resistance to kynurenic acid of the NMDA receptor-dependent toxicity of 3-nitropropionic acid and cyanide in cerebellar granule neurons. *Brain Res*, 1215: 200-207.
48. Mackenzie IRA (2007). Neuropathology of Alzheimer's Disease. In: Feldman HH. *Atlas of Alzheimer's Disease*. Informa Healthcare, United Kingdom pp:71-83.
49. Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira C. (2004). Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res*, 76:872-880.
50. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366:2112–2117.
51. Fitzjohn SM, Morton RA, Kuenzi F, Rosahl TW, Shearman M, Lewis H, et al. (2001). Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 21: 4691-4698.
52. Ford LM, Norman AB, Sanberg PR. (1989). The topography of MK-801-induced locomotor patterns in rats. *Physiol Behav*, 46: 755-758.
53. Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. (1984). Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett*, 48: 273-278.

54. Freir DB, Costello DA, Herron CE. (2003). A beta 25–35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil. *J Neurophysiol*, 89: 3061–3069.
55. Füvesi J, Somlai C, Németh H, Varga H, Kis Z, Farkas T, et al. (2004). Comparative study on the effects of kynurenic acid and glucosamine–kynurenic acid. *Pharmacol Biochem Behav*, 77: 95-102.
56. Gamache DA & Ellis EF. (1986). Effect of dexamethasone, indomethacin, ibuprofen, and probenecid on carrageenan-induced brain inflammation. *J Neurosurg*, 65: 686-692.
57. Garcia JH, Liu KF, Ho KL. (1995). Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progress at different time intervals in the caudo-putamen and the cortex. *Stroke*, 26: 636–42.
58. Gigler G, Szenasi G, Simo A, Levay G, Harsing Jr LG, Sas K. et al. (2007). Neuroprotective effect of L-kynurenine sulfate administered before focal cerebral ischemia in mice and global cerebral ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol*, 564: 116-122.
59. Glenner GG & Wong CW. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 122: 1131–1135.
60. Goda K, Hamane Y, Kishimoto R, Ogishi Y. (1999). Radical scavenging of tryptophan metabolites: Estimation of their radical reactivity. Content in: Huether G, Kochen W, Simat TJ, Steinhart H, Editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Tryptophan, Serotonin and Melatonin. Basic Aspects and Applications*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

61. Goto Y, Niideome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. (2006). Amyloid β -peptide preconditioning reduced glutamate-induced neurotoxicity by promoting endocytosis of NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Comm*, 351:259-265.
62. Gotz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, et al. (2004). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry*, 9: 664-683.
63. Guembe-Echarri L. (2009). Técnicas inmunohistoquímicas. En: Montuenga L., Esteban-Ruiz F.J., Clavo-González A. *Técnicas en Histología y Biología Celular*. Elsevier Masson. España, pp: 119-149.
64. Guidetti P, Bates GP, Graham RK, Hayden MR, Leavitt BR, MacDonald ME., et al. (2006). Elevated brain 3 hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiol Dis*, 23: 190–197.
65. Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. (2004). Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 17: 455–461.
66. Guidetti P, Reddy PH, Tagle DA, Schwarcz R. (2000). Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model. *Neurosci Lett*, 283: 233–235.
67. Guillemín GJ & Brew BJ. (2002). Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep*, 7:199-206.
68. Guillemín GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. (2005). Indoleamine 2, 3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 31:395-404.

69. Guillemin GJ, Smythe GA, Veas LA, Takikawa O, Brew BJ. (2003). A beta 1-42 induces production of quinolinic acid by human macrophages and microglia. *NeuroReport*, 14: 2311-2315.
70. Guillemin GJ, Smith DG, Williams K, Smythe GA, Dormont D, Brew BJ. (2001). β -Amyloid peptide 1–42 induces human macrophages to produce the neurotoxin quinolinic acid. *J Neuroimmunol*, 118: 336.
71. Gulaj E., Pawlak K., Bien B., Pawlak D. Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. *Adv Med Sci* 2010;16:1-8.
72. Han Q, Beerntsen BT, Li J. (2007). The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *J Insect Physiol*, 53:254-263.
73. Hardeland R & Zsizsik BK. (1997). Kynurenic as a free radical scavenger. Measurements of educt and product fluorescence and of light emission from an excited intermediate state. In: Hardeland R. *Biological Rhythms and antioxidative protection*. Cuvillier, Gottingen, Germany, pp:153-160.
74. Hardy J & Allsop D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharm Sci*, 12: 383-388.
75. Hardy J & Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297: 353-356.
76. Hardy JA & Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 257: 184-185.
77. Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Toth B, Sasvari M, et al. (2000). Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci*, 12: 735–2745.

78. Harris CA. (1993). Antagonist of quinolinic acid induced toxicity on striatal diaphorase neurons following administration of kynurenine, probenecid and nicotinylalanine. *Soc Neurosci Abstr*, 19: 1342.
79. Hartai Z, Juhász A, Rimanóczy A, Janáky T, Donkó T, Dux L, et al. (2007). Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 50:308-313.
80. He LM, Chen LY, Lou XL, Qu AL, Zhou Z, Xu T. (2002). Evaluation of β -amyloid peptide 25–35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, 939:65-75.
81. Hesselink MB, Smolders H, Eilbacher B, De Boer AG, Breimer DD, Danysz W. (1999). The Role of Probenecid-Sensitive Organic Acid Transport in the Pharmacokinetics of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists Acting at the GlycineB-Site: Microdialysis and Maximum Electroshock Seizures Studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 290: 543-550.
82. Heyes MP, Chen CY, Major EO, Saito K. (1997). Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochem J*, 326: 351-356.
83. Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, et al. (1992). Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain*, 115:1249-1273.
84. Hilmas C, Pereira EFR, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci*, 21: 7463–7473.

85. Hlinak Z & Krejci I. (2006). Spontaneous alternation behaviour in rats: Kynurenic acid attenuated deficits induced by MK-801. *Behav Brain Res*, 168: 144-149.
86. Holscher C, Gengler S, Gault VA, Harriott P, Mallot HA. (2007). Soluble beta-amyloid [25–35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. *Eur J Pharmacol*, 56: 85-90.
87. Hoozemans JJM, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. (2006). Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int J Devl Neurosci*, 24: 157–165.
88. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 45:583-595.
89. Ikonomidou C & Turski L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol*, 1: 383-386.
90. Imbimbo BP. (2008). Therapeutic potential of γ -secretase inhibitors and modulators. *Curr Top Med Chem*, 8:54-61.
91. Institute of Laboratory Animal Resources. (1996). Commission of Life Sciences. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press. Washington, D.C.
92. Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, et al. (2005). Structure of β -Amyloid Fibrils and Its Relevance to Their Neurotoxicity: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J Biosci Bioengineering*, 99: 437-447.
93. Irifune M, Shimizu T, Nomoto M, Fukuda T. (1995). Involvement of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Noncompetitive NMDA Receptor Antagonist-Induced Hyperlocomotion in Mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 51: 291-296.

94. Izaute M & Bacon E. (2005). Specific effects of an amnesic drug: Effect of Lorazepam on study time allocation and on judgement of learning. *Neuropsychopharmacol*, 30: 196-204.
95. Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, Yamada K, Shin EJ, Jhoo WK, et al. (2004). Beta-amyloid (1-42) induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res*, 155:185-196.
96. Joshi S & Morley JE. (2006), Cognitive impairment. *Med Clin North Am*, 90:769-787.
97. Kaminsky TG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA. (2010). Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A β 25–35. *Exp Neurol*, 221: 26-37.
98. Kawahara M & Kuroda Y. (2000). Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's β -amyloid protein: Channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull*, 53:389-397.
99. Kemp JA & McKernan RM. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neurosci*, 5: 1039-1042.
100. Kern A & Behl C. (2009). The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta*, 1790: 1124-1132.
101. Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. (1989). A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic receptors: Characterization and identification of a new class of antagonist. *J Neurochem*, 52:1319-1328.
102. Kew JNC & Kemp JA. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacol*, 179: 4-29.

103. Kimelberg HK. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*, 45:191-202.
104. Kiyota Y, Miyamoto M, Nagaoka A. (1991). Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 538: 295-302.
105. Knox WE. (1953). The relation of liver kynureninase to tryptophan metabolism in pyridoxine deficiency. *Biochem J*, 53:379-385.
106. Koek W & Colpaert FC. (1990). Selective blockade of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced convulsions by NMDA antagonist and putative glycine antagonist: Relationships with phencyclidine-like behavioral effects. *J Pharmacol Exp Ther*, 252: 349-357.
107. Konradsson-Geuken A, Wu HQ, Gash CR, Alexander KS, Campbell A, Sozeri Y., et al. (2010). Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience*, 169:1848-1859.
108. Kontush A. (2001). Amyloid- β an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med*, 31:1120-1131.
109. Kotake Y, Ueda T, Mori T, Igaki S, Hattori M. (1975). Abnormal tryptophan metabolism and experimental diabetes by xanthurenic acid. *Acta Vitaminol. Enzymol*, 29: 236-240.
110. Kowall NW, McKee AC, Yankner BA, Beal MF. (1992). In vivo neurotoxicity of beta amyloid $\beta(1-40)$ and the $\beta(25-35)$ fragment. *Neurobiol Aging*, 13: 537-542.
111. Lanctot KL, Herrmann N, Yau KK, Khan RL, Lui BA, LouLou MM, et al. (2003). Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ*, 169:557-564

112. Lapin IP. (1978b) Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol Res Commun*, 10: 81-84.
113. Lapin IP. (1979) Effect of kynurenine and quinolinic acid on the action of convulsants in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 13: 17-20.
114. Lapin IP. (1981a) Kynurenine and seizures. *Epilepsia*, 22: 257-265.
115. Lapin IP. (1981b). Nicotinamide, inosine and hypoxanthine, putative endogenous ligands of the benzodiazepine receptor, opposite to diazepam are much more effective against kynurenine-induced seizures than against pentylenetetrazol induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav*, 14: 589-593.
116. Lapin IP. (1978a). Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm*, 42:37-43.
117. Lau TL, Gehman JD, Wade JD, Pérez K, Masters CL, Barnham KJ, et al. (2007). Membrane interactions and the effect of metal ions of the amyloidogenic fragment A β (25–35) in comparison to A β (1–42). *Biochim Biophys Acta*, 1768: 2400-2408.
118. Lederer R, Radeke E, Mondadori C. (1993). Facilitation of social learning by treatment with an NMDA receptor antagonist. *Behav Neural Biol*, 60: 220-224.
119. Leeson PD & Iversen LL. (1994). The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Chem*, 37: 4053-4067.
120. Lekieffre D, Plotkine M, Boulu A, Boulu RG. (1990). Kynurenic acid antagonizes hippocampal quinolinic acid neurotoxicity: behavioral and histological evaluation. *Neurosci Lett*, 120: 31-33.

121. Lesne S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, et al. (2005). NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci*, 25: 9367–9377.
122. Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. (2009). Soluble oligomers of Amyloid β Protein facilitate hippocampal Long-Term Depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 62: 788-801.
123. Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SKF. (1996). β -Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res*, 738: 196-204.
124. Lin H, Bhatia R, Lal R. (2001). Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J*, 15: 2433-2444.
125. Lipton SA. (2004). Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx*, 1:101-110.
126. Manzano S, González JL, Marcos A, Payno M, Villanueva C, Matias Guiu J. (2009). Modelos experimentales de la Enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 24:255-262.
127. Marosi M, Nagy D, Farkas T, Kis Z, Rozsa E, Robotka H, et al. (2010). A novel kynurenic acid analogue: a comparison with kynurenic acid. An in vitro electrophysiological study. *J Neural Transm*, 117:183-188.
128. Mayer ML & Armstrong N. (2004). Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol*, 66:161–181.
129. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. (1989). Neuroprotective effects of MK-801, TCP, PCP and CPP against N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in an in vivo perinatal rat model. *Brain Res*, 490:33-40.

130. Meda L, Baron P, Prat E, Scarpini E, Scarlato G, Cassatella MA, et al. (1999). Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with β -amyloid 25–35. *J Neuroimmunol*, 93:45-52.
131. Michaelis EK. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*, 54:369-415.
132. Miller J, MacGarvey U, Beal MF. (1992). The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations. *Neurosci Lett*, 146:115-118.
133. Miranda AF, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. (1997). Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. *Neuroscience*, 78: 967-975.
134. Miranda AF, Sutton MA, Beninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ. (1999). Quinolinic acid lesion of the nigrostriatal pathway: effect on turning behaviour and protection by elevation of endogenous kynurenic acid in *rattus norvegicus*. *Neurosci Lett*, 262:81-84.
135. Mok MHS, Fricker AC, Weil A, Kew JNC. (2009) Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. *Neuropharmacol* 57: 242-249.
136. Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fragg GE. (1989). NMDA receptor antagonist can enhance or impair learning performance in animals. *Exp Brain Res*, 75:449-456.
137. Mook-Jung I, Joo I, Sohn S, Jae Kwon H, Huh K, Jung MW. (1997). Estrogen blocks neurotoxic effects of β -amyloid (1–42) and induces neurite extension on B103 cells. *Neurosci Lett*, 235: 101-104.

138. Moreno H, Yu E, Pigino G, Hernandez AI, Kim N, Moreira JE. (2009). Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 5901-5906.
139. Moroni F, Russi P, Lombardi G, Beni M, Carla V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *J Neurochem*, 51: 177-180.
140. Moroni F, Russy P, Gallo-Mezo MA, Moneti G, Pellicciari R. (1991). Modulation of quinolinic and kynurenic acid content in the rat brain: Effect of endotoxins and nycotinilalanina. *J Neurochem*, 67:1630-1635.
141. Morris RGM. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motivation*, 12: 239-260.
142. Mourdian MM, Heyes MP, Pan JB, Heuser IJE, Marker SP, Chase TN. (1989). No changes in central quinolinic acid levels in Alzheimer disease. *Neurosci Lett*, 105:233-238.
143. Muir KW & Lees KR. (1995). Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke*, 26: 503-513.
144. Muir KW. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: Clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol*, 6:53-60.
145. Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY. (2002). Intracellular accumulation of beta amyloid (1–42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 110: 199–211.
146. Nemeth H, Toldi J, Vecsei L. (2006). Kynurenines, Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical studies. *J Neural Transm*, 70: 285-304.

147. Nemeth H, Toldi J, Vecsei L. (2005). Role of Kynurenines in the Central and Peripheral Nervous Systems. *Curr Neurovasc Res*, 2: 249-260.
148. Niidome T., Goto Y., Kato M., Wang P.L., Goh S., Tanaka N. et al. (2009). Non-fibrillar amyloid-beta peptide reduces NMDA-induced neurotoxicity, but not AMPA-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 386:734-738.
149. Nishi M., Hinds H., Lu H.P., Kawata M., Hayashi Y. (2001). Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA type glutamate receptor subunit that works in a dominant negative manner. *J Neurosci* 2001; 21:RC185: 1-6.
150. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive Gliosis. *Neurochem Res*,17: 877–85.
151. O'Keefe J. & Nader L. (1978). Anatomy of the hippocampus. In: *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press, pp:103-140.
152. Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R., et al. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques, tangles: intracellular A β , synaptic dysfunction. *Neuron*, 39: 409-421.
153. Pakaski M. & Kalman J. (2008). Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 53: 103-111.
154. Parameshwaran K., Dhanasekaran M., Suppiramaniam V. (2008). Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp Neurol*, 210: 7-13.
155. Parsons C.G., Stoffler A., Danysz W. (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacol*, 53: 699-723.

156. Pawlak K., Brzosko S., Mysliwicz M., Pawlak D. (2009a). Kynurenine, quinolinic acid—The new factors linked to carotid atherosclerosis in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*, 204:561-566.
157. Pawlak K., Domaniewski T., Mysliwicz M., Pawlak D. (2009b) The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*, 204:309-314.
158. Paxinos G. & Watson G. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, USA.
159. Pellicciari R., Natalini B., Costantino G., Mahmoud M.R., Mattoli L., Sadeghpour B.M. et al. (1994). Modulation of the kynurenine pathway in search for new neuroprotective agents. Synthesis and preliminary evaluation of (m-nitrobenzoyl)alanine, a potent inhibitor of kynurenine-3-hydroxylase. *J Med Chem*, 37:647-655.
160. Peña E, Gutierrez –Lerma AI, Quiroz-Baez R, Arias C. (2006). The Role of β -Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol*, 4: 149-163.
161. Pérez de la Cruz V. & Santamaría A. (2007). Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence. *Physiol Res*, 56:513-526.
162. Pérez de la Cruz V., Konigsberg M., Santamaría A. (2007). Kynurenine pathway and Disease: An Overview. *CNS Neurol Disord Drug Targ*, 6:398-410.
163. Pérez-Severiano F., Salvatierra-Sánchez R., Rodríguez-Pérez M., Cuevas-Martínez E.Y., Guevara J., Limón D., et al. (2004). S-Allylcysteine prevents

- amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol*, 489:197-202.
164. Perkins M.N. & Stone T.W. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res*, 247:184-187.
165. Peters J. C. (1991). Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv Exp Med Biol*, 294: 345-358.
166. Pigino G., Morfini G., Atagi Y., Deshpande A., Yu C., Jungbauer L. et al. (2009). Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:5907-5912.
167. Poeggeler B., Reiter R.J., Hardeland R., Tan D.X., Barlow-Walden L.R. (1996). Melatonin and structurally-related endogenous indoles acts as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox Rep*, 2:179-184.
168. Pym L.J., Buckingham S.D., Tsetlin V., Boyd C.A.R., Sattelle D.B. (2007). The A β 1–42M35C mutated amyloid peptide A β 1–42 and the 25–35 fragment fail to mimic the subtype-specificity of actions on recombinant human nicotinic acetylcholine receptors (α 7, α 4 β 2, α 3 β 4). *Neurosci Lett*, 427: 28-33.
169. Radde R., Duma C., Goedert M., Jucker M. (2008). The value of incomplete mouse models of Alzheimer's Disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35 (Supp1):S70-S74.
170. Raffi M.S. & Aisen P.S. (2009). Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Medicine*; 7: 7-10.
171. Rahman A., Ting K., Cullen K.M., Braidy N., Brew B.J., Guillermin G.J. (2009). The Excitotoxin Quinolinic Acid Induces Tau Phosphorylation in Human Neurons. *PLoS ONE*, 4: 1-15.

172. Reddy P.H. & Beal M.F. (2007). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trend Mol Med*, 45: 53.
173. Riedel G., Platt B., Micheau J. (2003). Glutamate receptor functions in learning and memory. *Behav Brain Res*, 140:1-47.
174. Rigby M., Le Bourdelles B., Heavens R.P., Kelly S., Smith D., Butler A., et al. (1996). The messenger RNAs for the N-methyl-D-aspartate receptor subunits show region-specific expression of different subunit composition in the human brain. *Neuroscience*, 73: 429-447.
175. Rios C. & Santamaría A. (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res*, 16:1139-1143.
176. Robotka H., Sas K., Agoston M., Rozsa E., Szenasi G., Gigler G. et al. (2008). Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sci*, 82: 915-919.
177. Romani L., Zelante T., De Luca A., Fallarino F., Puccetti P. (2008). IL-17 and Therapeutic Kynurenines in Pathogenic Inflammation to Fungi. *J Immunology*, 180: 5157-5162.
178. Rosales-Corral S., Tan D.X., Reiter R.J., Valdivia-Velazquez M., Acosta-Martinez J.P., Ortiz G.G. (2004). Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid- β onto the hippocampus in vivo. *J Neuroimmunol*, 150: 20-28.
179. Rossi F., Schwarzc R., Rizzi M. (2008). Curiosity to kill the KAT (kynurenine aminotransferase): structural insights into brain kynurenic acid synthesis. *Curr Op Structural Biol*, 18: 748-755.

180. Rovira C., Arbez N., Mariani J. (2002). A β (25–35) and A β (1–40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Com*, 296: 1317–1321.
181. Saito K., Fujigaki S., Heyes M.P., Shibata K., Takemura M., Fujii H., et al. (2000). Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279:565-572.
182. Santamaría A. & Jiménez M. E. (2005). Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview. *Curr Top Neurochem*, 4:1-20.
183. Santamaría A. & Rios C. (1993). MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett*, 159: 51-54.
184. Santamaría A., Rios C., Solis-Hernandez F., Ordaz-Moreno J., González-Reynoso S., Altagracia M., Kravzov J. (1996). Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacol*, 35: 23-28.
185. Sarasa M. (2006). Modelos experimentales de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*, 42: 297-301.
186. Sas K., Robotka H., Rozsa E., Agoston M., Szenasi G., Gigler G. et al. (2008). Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis*, 32: 302-308.
187. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. (1999). Immunization with amyloid beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400:173–177.

188. Schmid A.W., Freir D.A., Herron C.E. (2008). Inhibition of LTP *in vivo* by beta-amyloid peptide in different conformational states. *Brain Res*, 1197: 135-142.
189. Schwarcz R. & Kohler C. (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci Lett*, 38: 85-90.
190. Schwarcz R. & Pellicciari R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: Glial targets, neuronal effects and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*, 303:1-10.
191. Schwarcz R., Guidetti P., Sathyaikumar K.V., Muchowski P.J. (2010). Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, 90:230-245.
192. Schwarcz R., Whetsell W. O., Mangano R. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that causes axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 219: 316-318.
193. Selkoe D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298:789–791.
194. Selkoe D.J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, 192:106-113.
195. Shiosaka S. (1992). Attempts to make models for Alzheimer's Disease. *Neurosci Res*, 13:237-255.
196. Silva-Adaya D., Pérez-De La Cruz V., Herrera-Mundo M.N., Mendoza-Macedo K., Villeda-Hernández J., Binienda Z., Syed F. Ali, Abel Santamaría. (2008). Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects. *J Neurochem*, 105:677-689.
197. Silva-Adaya D., Pérez De la Cruz V., Villeda-Hernández J., Carrillo-Mora P., González-Herrera I.G., García E., Colín-Barenque L., Pedraza-Chaverrí J.,

- Santamaría A. (2010) Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: Implications of modulating kynurenate as a protective strategy. *Neurotoxicol Teratol* (Article in press) doi:10.1016/j.ntt.2010.10.002
198. Silverman W., Locovei S., Dahl G. (2008). Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295:C761-C767.
199. Smith G. (1988). Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. *Brain Res Rev*, 13:103-118.
200. Smith M.A., Casadesus G., Joseph J.A., Perry G. (2002). Amyloid β and τ serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain. *Free Rad Biol Med*, 33: 1194-1199.
201. Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 8: 1051–1058.
202. Sofic E., Halket J., Przyborowska A., Riederer P., Beckmann H., Sandler M., et al. (1989). Brain quinolinic acid in Alzheimer's dementia. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*, 239: 177-179.
203. Speciale CHQ, Wu JBP, Gramsbergen WA, Turski V. Ungerstedt R. Schwarcz R. (1990). Determination of extract kynurenic acid in the striatum of unanesthetized rats: Effect of the aminoxyacetic acid. *Neurosci Lett*, 116: 198.
204. Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Yakovlev A., Khrenov A.I., Peregud D.I., Vorontsova O.N et al. (2008). Amyloid β 25-35 increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem Int*, 52:1114-1124.
205. Stepanichev M.Y., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Onufriev M.V., et al. (2004). Amyloid- β (25–35)-induced memory

- impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav*, 80: 647-655.
206. Stephan A. & Phillips A.G. (2005). A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Gen Brain Behav*, 4:157-172.
207. Stone T. W. & Perkins M. N. (1981). Quinolinic acid. A potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Europ J Pharmacol*, 72: 411-412.
208. Stone T.W. (2000). Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 21: 149-154.
209. Stone T.W. (2001). Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol*, 64: 185-218.
210. Stone T.W. (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*, 45: 309-379.
211. Suzuki Y., Suda T., Furuhashi K., Suzuki M., Fujie M., Hahimoto D., et al. (2010). Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer*, 67:361-365.
212. Swartz, K.J., During, M.J., Freeze, A. and Beal, M.F. (1990). Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *J Neurosci*, 10: 2965-2973
213. Tamagno E., Parola M., Guglielmotto M., Santoro G., Bardini P., Marra L. et al. (2003). Multiple signaling events in amyloid β -induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Rad Biol Med*, 35: 45-58.
214. Tampellini D., Rahman N., Gallo E.F., Huang Z., Dumont M., Capetillo-Zarate E., et al. (2009). Synaptic Activity Reduces Intraneuronal A β , Promotes APP

- Transport to Synapses, and Protects against A β -Related Synaptic Alterations. *J Neurosci*, 29:9704-9713.
215. Thal D.R., Rub U., Orantes M., Braak H. (2002). Phases of A β deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58: 1791-1800.
216. Ting K.K., Brew B., Guillemin G. (2007). The Involvement of Astrocytes and Kynurenine Pathway in Alzheimer's Disease. *Neurotox Res*, 12: 247-262.
217. Tohda, C., Tamura, T., Komatsu, K. (2003). Repair of amyloid beta (25–35)-induced memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to. *Brain Res*, 990: 141–147.
218. Torres-Seco F. (2002). *Manual de tecnicas en histologia y anatomia patologica*. Edit. Ariel Practicum. España, pp: 53-67.
219. Town T. (2009). Alternative A β immunotherapy approaches for Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 8:114-127.
220. Tozaki H., Matsumoto A., Kanno T., Nagai K., Nagata T., Yamamoto S., et al. (2002). The inhibitory and facilitatory actions of amyloid- β peptides on nicotinic ACh receptors and AMPA receptors. *Biochem Biophys Res Comm*, 294: 42-45.
221. Treusch S. Cyr D.M. (2009). Lindquists S. Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle*, 8:1668-1674.
222. Trubetskaya V.V., Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Lazareva N.A., Markevitch V.A., Gulyaeva N.V. (2003). Administration of aggregated beta-amyloid peptide (25-35) induces changes in long term potentiation in the hippocampus in vivo. *Neurosci Behav Physiol*, 33: 95-98.
223. Trump BF, Berezesky IK, Sato T, Laiho KU, Phelps PC, DeClaris N. (1984). Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect*, 57: 281–7.

224. Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB. (2004). Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities, breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci*, 7: 1181-1183.
225. Turski M.P., Turska M., Zgrajka W., Kuc D., Turski W.A. (2009). Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids*, 36:75-80.
226. Turski W.A., Nakamura M., Todd W.P., Carpenter B.K., Whetsell W.O., Schwarcz R. (1988). Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. *Brain Res*, 454:164-169.
227. Urbanska E.M., Lochowski P., Luchowska E., Pniewski J., Wozniak R., Chodakowska Zebrowska M., et al. (2006). Serum kynurenic acid positively correlates with cardiovascular disease risk factor, homocysteine: a study in stroke patients. *Pharmacol Rep*, 58: 507-511.
228. Vamos E., Pardutz A., Klivenyi P., Toldi J., Vecsei L. (2009). The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: Possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci*, 283: 21-27.
229. Vecsei L. & Beal F. (1990). Intracerebroventricular injection of kynurenic acid, but not kynurenine, induces ataxia and stereotyped behaviour in rats. *Brain Res Bull*, 25:623-627.
230. Vecsei L. & Miller J.M. (1992). Effects of kynurenine and probenecid on plasma and brain tissue concentrations of kynurenic acid. *Neurodegen*, 1:17-26.
231. Vecsei L., Miller J., MacGarvey U., Beal M.F. (1992). Kynurenine and probenecid inhibit pentylentetrazol- and NMDLA-induced seizures and increases kynurenic acid concentrations in the brain. *Brain Res Bull*, 28:233-238.
232. Vetrivel K. S. & Thinakaran G. (2006). Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*, 66 (Suppl 1):S69-S73.

233. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416: 535-539.
234. Walter, M. F.; Mason, P. E.; Mason, R. P. (1997). Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25–35 inhibits lipid peroxidation as a result of its membrane interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 233:760–764.
235. Wang X., Su B., Perry G., Smith M.A., Zhu X. (2007). Insights into amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Free Rad Biol Med*, 43: 1569-1573.
236. Wenk G.L., Parsons C.G., Danysz W. (2006). Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav Pharmacol*, 17: 411–424.
237. Widner B., Leblhuber F., Walli J., Tiltz G.P., Demel U., Fuchs D. (1999). Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. *Adv Exp Med Biol*, 467:133-138.
238. Wolfensberger M., Amlser U., Cuénod M., Foster A.C., Whetsell W.O., Schwarcz R. (1983). Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett*, 41:247-252.
239. Wozniak D.F., Olney J.W., Kettinger L., Price M., Miller J.P. (1990). Behavioral effects of MK-801 in the rat. *Psychopharmacol*, 101: 47-56.
240. Wu HG, Ungerstedt U, Schwarcz R. (1992). Regulation of kynurenic acid synthesis studied by microdialysis in the dorsal hippocampus of unanesthetized rats. *Eur J Pharmacol*, 213:375-380.
241. Yamada A., Akimoto H., Kagawa S., Guillemin G.J., Takikawa O. (2009). Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases induction of indoleamine

- 2,3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 110;791-800
242. Yankner B.A. & Lu T. (2009). Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 284:4755-4759.
243. Yankner B.A., Duffy L.K., Krischner D.A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250: 279-282.
244. Żarnowski T., Rejdak R., Zielińska-Rzecka E., Zrenner E., Grieb P., Zagórski Z., et al. (2007). Elevated Concentrations of Kynurenic Acid, a Tryptophan Derivative, in Dense Nuclear Cataracts. *Curr Eye Res*, 32: 27-32.
245. Zdzisinska B., Wejkszaa K., Walter-Croneckb A., Turski W.A., Kandefer-Szerszeń M. (2010). Kynurenic acid in blood and bone marrow plasma of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma (MM) patients. *Leukemia Res*, 34: 38-45.
246. Zhang J., Hou L., Gao X., Guo F., Jing W., Qi J. et al. (2009). Amyloid β -protein differentially affects NMDA receptor- and GABA_A receptor-mediated currents in rat hippocampal CA1 neurons. *Prog Nat Sci*, 19:963-972.
247. Zoladz P.R., Campbell A.M., Park C.R., Schaefer D., Danysz W., Diamond D.M. (2006). Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. *Pharmacol Biochem Behav*, 85: 298-306.
248. Zsizsik B.K. & Hardeland R. (2002). Formation of kynurenic and xanthurenic acids from kynurenine and 3-hydroxykynurenine in the dinoflagellate

Lingulodinium polyedrum: role of a novel, oxidative pathway. *Com Biochem Physiol Tox Pharmacol*, 133:383-392.