



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**NEUROPROTECCIÓN EN LOS RATONES CON MUTACIÓN  
NULA PARA LA  $n$ NOS ANTE EL DAÑO OXIDATIVO  
INDUCIDO POR QUIN: RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE  
LA HUNTINGTINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**CRISTIAN GERÓNIMO OLVERA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO  
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.

1. Datos del Alumno

Gerónimo

Olvera

Cristian

56 53 45 02

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

407099735

2. Datos del Asesor

Doctora

Francisca

Pérez

Severiano

3. Datos del sinodal 1

Doctora

Rocío

Salceda

Sacanelles

4. Datos del sinodal 2

Doctora

Penélope

Aguilera

Hernández

5. Datos del sinodal 3

Doctora

Alette

Ortega

Gómez

6. Datos del sinodal 4

Doctor

Sergio

Montes

López

7. Datos de la Tesis

Neuroprotección en los ratones con mutación nula para la nNOS ante el daño oxidativo inducido por QUIN: Relación con la expresión de la Huntingtina

45p

2011

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
Óxido nítrico (NO)	2
El NO y su relación con las enfermedades neurodegenerativas	3
Modelos experimentales para la EH	4
Ratón con mutación nula para la nNOS (-/-)	5
El NO y el estrés oxidativo	5
Huntingtina y su relación con la excitotoxicidad	7
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
General	14
Particulares	14
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
Material biológico	15
Identificación del genotipo de los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS	15
Determinación del daño oxidativo	17
Determinación del daño neuronal	18
Análisis del sistema nitrérgico	19
Determinación de la expresión del gen de la htt.	21
Análisis estadístico	23
<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>39</b>

## RESUMEN

La utilización de animales transgénicos es una herramienta valiosa para el estudio de la función de una molécula en un evento fisiopatológico. El óxido nítrico (NO) es mediador de daño celular por estrés oxidativo generando desbalance entre sistemas prooxidantes y antioxidantes. En la enfermedad de Huntington (EH) causada por la expansión del tracto de poliglutamina de la proteína huntingtina (htt), esta demostrada la participación de la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) en el mecanismo de neurodegeneración. La relación entre la expresión de la huntingtina mutada (mhtt) y la muerte de las neuronas estriatales observada en la EH es un proceso no comprendido del todo. El incremento en la expresión de la htt posterior a la sobreactivación de los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAr) por su agonista ácido quinolínico (QUIN) está ampliamente reportado, así como el incremento de la actividad de la nNOS. El objetivo del presente proyecto fue evaluar la participación de la nNOS en el estrés oxidativo inducido por QUIN y su relación con la expresión de la htt en ratones con mutación nula para la nNOS (-/-). Para lo cual se identificó el genotipo de la colonia de ratones con mutación nula para la nNOS (-/-). Se realizó la lesión intraestriatal con QUIN (30 nM) o solución salina isotónica y 2 horas después se evaluó: 1) el estrés oxidativo peroxidación de lípidos y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), 2) la actividad y expresión de la NOS y 3) la expresión de ARN mensajero de la htt. Adicionalmente a grupos independientes de ratones, se les evaluó la conducta de giro y los niveles de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), tres días posterior a la lesión con QUIN. De la colonia de ratones se obtuvieron 3 genotipos: homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos con mutación nula (-/-). Los ratones con mutación nula para la nNOS (-/-) mostraron una disminución de la conducta de giro y conservación de GABA; este mismo grupo mostró una protección significativa en el estriado contra el estrés oxidativo inducido por QUIN con respecto a los genotipos homocigotos y heterocigotos. Se observó un incremento de la expresión del ARN mensajero de la htt de los 3 genotipos lesionados con QUIN respecto a sus controles. Estos resultados demuestran la participación del NO en el daño oxidativo y el proceso de neurodegeneración inducido por QUIN. El incremento de la expresión de la htt en respuesta al daño agudo inducido por QUIN podría explicar parcialmente la neurodegeneración observada en la EH.

# INTRODUCCIÓN

Desde hace tres décadas, las técnicas asociadas con la manipulación del genoma del ratón resultaron ser un recurso importante para tener una mayor comprensión de la función de genes en los procesos fisiológicos y patológicos en muchos campos de la investigación biomédica (Gao *et al.*, 1999). Actualmente, el direccionamiento genético y la manipulación de genes son herramientas utilizadas para la formación de organismos transgénicos, que se usan ampliamente como una herramienta en la evaluación de la función de genes *in vivo*, además de proveer de un recurso molecular útil para el establecimiento de modelos animales que simulan las enfermedades humanas y de esta forma probar nuevas propuestas terapéuticas (Gao *et al.*, 1999). En especial los ratones con mutación nula para la sintasa del óxido nítrico nNOS (-/-) son utilizados en numerosos estudios para el mejor entendimiento de la función fisiológica de la nNOS y del óxido nítrico (NO) en el sistema nervioso central (SNC).

## Óxido nítrico

El NO, es un gas soluble considerado como neurotransmisor retrógrado en el cerebro, ya que induce la liberación presináptica de glutamato a través de mecanismos asociados a la activación de la guanilato ciclasa (GC). El NO desempeña diversas funciones fisiológicas como la modulación de la transmisión sináptica, regulación de la presión sanguínea, inhibe la agregación plaquetaria, potenciación hipocámpal a largo plazo, relajación de músculo liso, morfogénesis, regulación de la expresión de genes y procesos inhibitorios asociados con conducta agresiva y sexual (Luo *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2001). A nivel del SNC, el NO regula la liberación de diversos neurotransmisores como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), serotonina, glutamato, acetilcolina y noradrenalina, y está involucrado en procesos de neurodegeneración mediante la participación de receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Pérez-Severiano *et al.*, 1998). El NO puede desempeñar un papel dual entre neuroprotector y

neurotóxico dependiendo del estado oxidativo de la molécula, de las concentraciones del mismo, de la isoforma de la sintasa del óxido nítrico involucrada y del evento patológico inicial (Deckel, 2001).

El NO es sintetizado por la interconversión estequiométrica de L-arginina a L-citrulina por las sintasas del óxido nítrico (NOS), de la cual existen tres isoformas que se encuentran en el SNC: sintasa del NO neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) (Calabrese *et al.*, 2007). Siendo la nNOS la principal fuente de NO en el cerebro, ya que se encuentra en una concentración alta en la región post-sináptica estrechamente relacionada al receptor de glutamato de tipo NMDA (Jekansone *et al.*, 2007). Las nNOS y eNOS se expresan constitutivamente y requieren de la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina para su activación (denominadas en conjunto cNOS), mientras que la iNOS ejerce su actividad de forma independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las tres isoformas requieren de co-factores como un grupo hemo, tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), FAD<sup>+</sup> y NADH para su actividad catalítica (Calabrese, 2007).

### **El NO y su relación con las enfermedades neurodegenerativas**

El NO en el SNC está involucrado en la fisiopatología de la muerte neuronal en el envejecimiento, la isquemia, el trauma, infección cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas tales como en la de Alzheimer, Parkinson y Huntington. El mecanismo común que podría estar participando en estas enfermedades es el daño oxidativo, debido al desbalance entre sistemas oxidantes y antioxidantes, así como su relación entre la activación de los NMDAr y la estimulación de la GC (Choi, 1998; Calabrese, 2007).

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo hereditario causado por una expansión en la repetición del triplete CAG para el tracto de poliglutamina de la proteína huntingtina (htt) (Bates *et al.*, 2002). Las características fenotípicas de la EH son la consecuencia de la muerte progresiva de neuronas espinosas medianas (MSN) en el estriado, núcleo principal de los

ganglios basales los cuáles controlan principalmente el movimiento. Las MSN constituyen el 95% del total de la población neuronal con aferencias corticales, las cuales liberan glutamato, el principal neurotransmisor excitador en el cerebro de los mamíferos. Además, el glutamato puede causar la muerte neuronal a través de un mecanismo conocido como excitotoxicidad (Estrada *et al.*, 2008).

Aunque muchos de los mecanismos por los cuales la mutación de la *htt* en la EH genera daño celular y neurodegeneración, permanecen sin entenderse completamente; se propone que el aumento en la expresión de la nNOS y ciertos defectos en el metabolismo energético de las células afectadas, provocan la formación de radicales libres induciendo daño oxidativo. Al respecto existen evidencias en modelos de la EH posterior a la inyección de excitotoxinas e inhibidores mitocondriales (Pérez-Severiano *et al.*, 2002; Schwarcz *et al.*, 2009). De igual forma se postula que un factor crítico en la patogénesis de la EH, es el incremento en la sensibilidad de las neuronas estriatales a la activación de NMDAR por glutamato, generando así la neurodegeneración por excitotoxicidad (Beal, 1992; Pérez-Severiano *et al.*, 2002; Leavitt *et al.*, 2006).

### **Modelos experimentales para la EH**

Existen diversos modelos experimentales, basados en la administración de excitotoxinas que pretenden simular los mecanismos celulares y moleculares por los cuales se genera muerte neuronal en la EH. Una de estas toxinas, el ácido quinolínico (QUIN; 2,3-piridina ácido dicarboxílico), derivado del metabolismo del L-triptofano y perteneciente a la vía de las kinureninas (VK), está asociado a la muerte neuronal en la EH. El QUIN es una potente excitotoxina a nivel estriatal que causa la disminución de los niveles de ATP y del GABA produciendo la clásica neurodegeneración de la EH sin afectar los axones provenientes de la corteza (Leipnitz *et al.*, 2005). La neurotoxicidad inducida por el QUIN se produce por la activación selectiva de los receptores a NMDA y a su escasa afinidad por los receptores de tipo AMPA (Schwarcz *et al.*, 2009). Es así que la sobreactivación de los receptores a NMDA, permite la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula,

que al cabo de unas horas se traduce en una concentración hiperfisiológica. Los niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones patológicas, generan una cascada de eventos neurotóxicos, que eventualmente llevan a la muerte de las neuronas afectadas.

### **Ratón con mutación nula para la nNOS (-/-)**

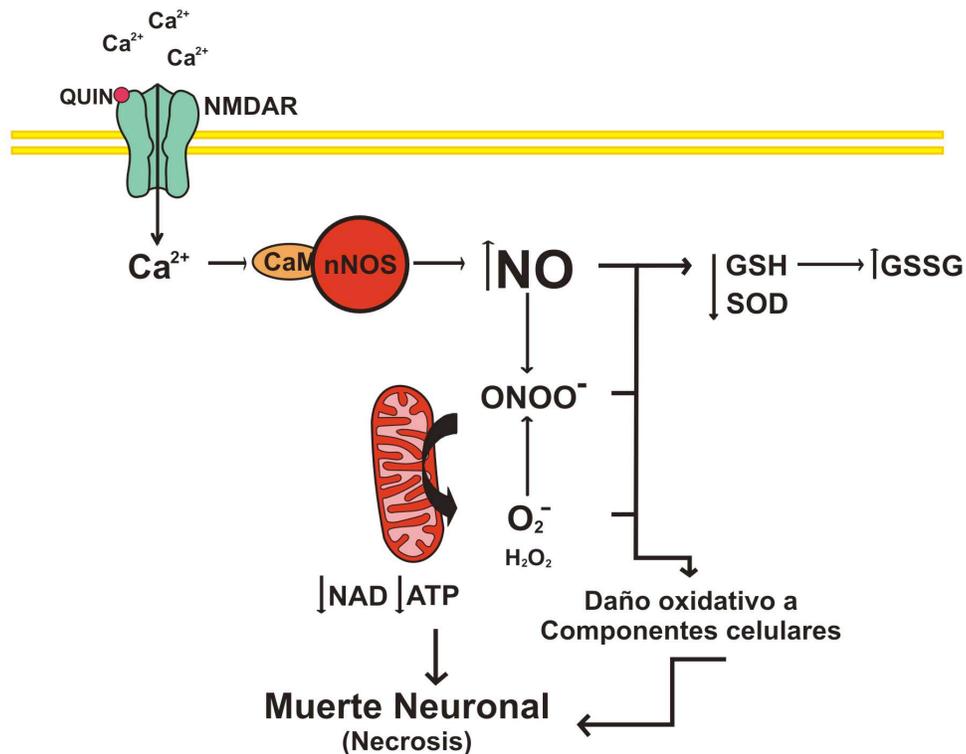
El grupo de Huang (1993), aisló, clonó y mapeó el gen de la nNOS en líneas de las células embrionarias J1, dirigidas por el promotor 129/Sv de ratón. Usando el vector pPNT se utilizó como selección positiva el gen de resistencia a neomicina y como control de selección negativa el gen de la cinasa de timidina del virus del herpes simple. Por recombinación homóloga, el vector se incorporó en el primer exón del gen de la nNOS. El primer exón contiene el codón de iniciación ATG y los codones para los aminoácidos 1-159, los cuales son reemplazados por el gen de resistencia a neomicina. Los ratones con mutación nula para la nNOS (-/-) muestran una disminución del 95-99 % de la expresión del gen para la nNOS. Los ensayos de inmunohistoquímica contra nNOS y NADPH-diaforasa, así como los de su actividad, mostraron ausencia de ésta en el cerebro y en tejidos periféricos, en comparación con los animales silvestres (Huang, 1999). Aunque no se reportan problemas de fertilidad, muestran una variedad de anormalidades como: alargamiento del estómago, hipertrofia de la vejiga y reducción del tono parasimpático entre otras. Además el macho nNOS (-/-) muestra un incremento en la conducta agresiva y sexual (Huang, 1999; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007). La amplia caracterización de los ratones con mutación nula para la nNOS (-/-), los hacen más valiosos en el estudio de mecanismos de daño en la EH.

### **El NO y el estrés oxidativo**

La muerte neuronal y el efecto tóxico generado por el NO en general depende de distintos parámetros: a) la concentración del NO, b) el tiempo de exposición de los componentes celulares al NO, c) la presencia o ausencia de niveles relevantes de

especies reactivas de oxígeno (ROS) y, d) la presencia o ausencia de ciertas vías de señalización de dicha célula (Brown, 2010).

Existe evidencia que el NO y las ROS inhiben componentes mitocondriales y por tanto la respiración mitocondrial. Las altas concentraciones de NO y la presencia de ROS causan la inhibición de la cadena respiratoria generando la liberación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de la mitocondria, dando lugar a una mezcla entre ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que son capaces de reaccionar entre sí y generar estrés nitro-oxidativo (Brown, 2010) (Ver figura 1).



**Figura 1.** Cascada de muerte celular excitotóxica. La entrada masiva de calcio ( $Ca^{2+}$ ) causada por la sobre-activación del receptor a glutamato tipo NMDA (NMDAR), estimula la actividad de la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS). La producción excesiva del óxido nítrico (NO) induce la producción de radicales libres, disfunción mitocondrial, la disminución de la defensas antioxidantes y el daño de componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN. La disfunción mitocondrial provoca la falla energética contribuyendo a la muerte celular (Modificada de Estrada *et al.*, 2008).

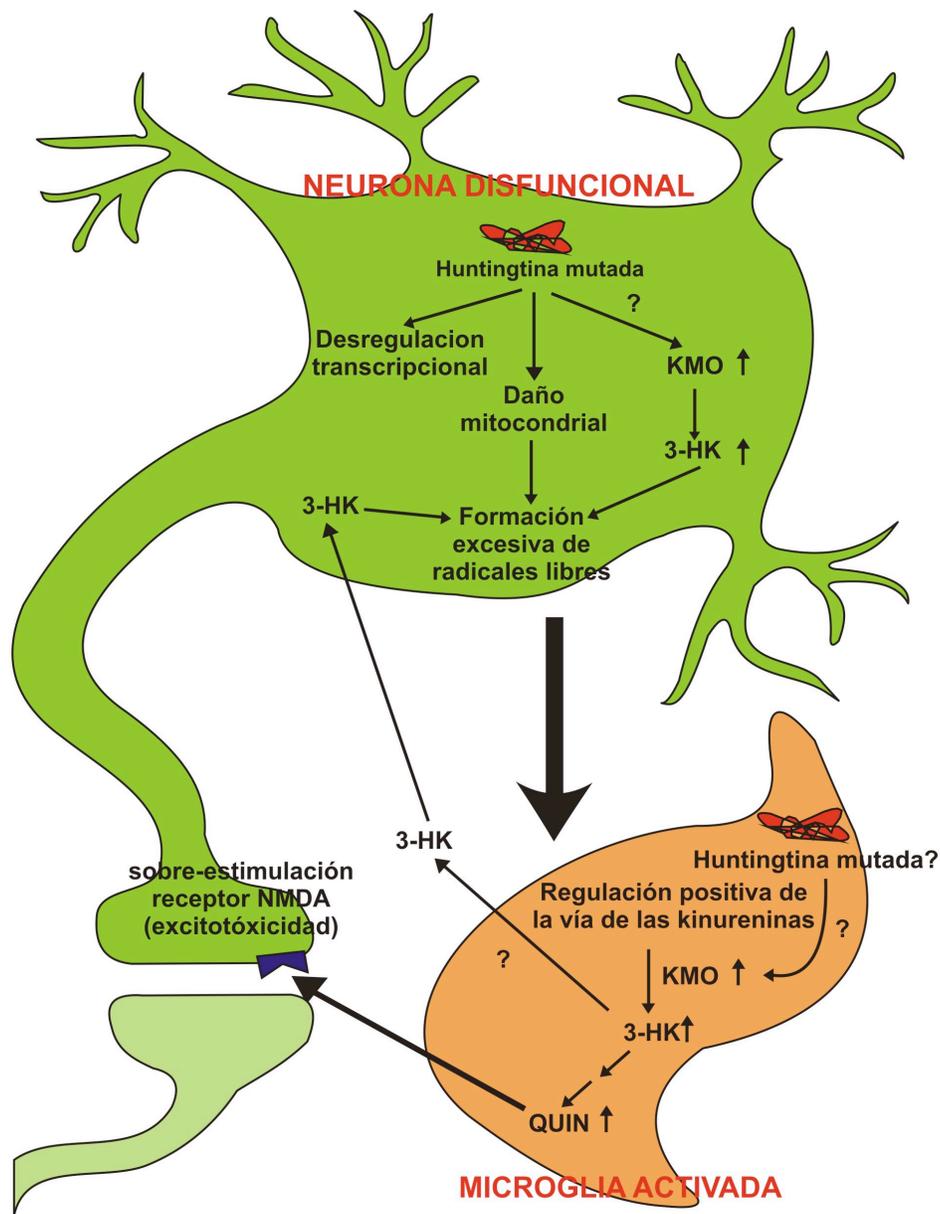
Uno de los eventos mejor descritos, asociados a la activación de receptores a NMDA, es la producción de NO. La entrada excesiva  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona, forma un complejo con la calmodulina (CaM) activando a la nNOS (Calabrese *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2008). La sobreproducción de NO desencadena una serie de eventos como la activación de la GC y la producción ROS y RNS, las cuales están relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas (Calabrese *et al.*, 2007). Bajo condiciones prooxidantes el NO reacciona con el oxígeno para producir nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) o  $\text{O}_2^-$ , para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un metabolito altamente reactivo que daña componentes celulares. Este agente nitrante es capaz de atacar y modificar proteínas, lípidos y ADN de tal manera que reduce las defensas de antioxidantes e inhibe la respiración mitocondrial (Pérez-Severiano *et al.*, 2002; Moncada, 2006; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007; Brown, 2010).

### **Huntingtina y su relación con la excitotoxicidad**

La htt es una proteína de ~350 kDa de expresión ubicua. En el SNC la proteína se localiza fundamentalmente en el citoplasma, asociada a membranas o al citoesqueleto del soma, dendritas, axones y terminales nerviosas. Debido a su interacción con ciertas proteínas, se le involucra con el transporte vesicular y tráfico membranal, así como con funciones del citoesqueleto. En la EH, se propone que la expansión del tracto de poliglutamina de la htt genera una nueva función tóxica. Hasta la fecha no se encuentra establecida la función de la htt mutada (mhtt) en la neurodegeneración selectiva de la EH, sobre todo cuando interactúa con otras proteínas y forma agregados (Nansheng *et al.*, 1999). Está demostrado que la forma soluble de la mhtt interacciona con las vesículas sinápticas inhibiendo la recaptura de glutamato, generando toxicidad a pesar de la formación de agregados proteínicos (Nansheng *et al.*, 1999).

Se postula que existe una interacción entre las repeticiones CAG de la htt y la producción de ATP mitocondrial, ya que se observa una disminución de los niveles de ATP, conforme aumenta el número de repeticiones del tracto de poliglutamina

en las neuronas estriatales (Bates *et al.*, 2002). El daño al metabolismo mitocondrial probablemente genera una disminución de la producción de ATP, que en conjunto con un reducido potencial de membrana mitocondrial y una mayor vulnerabilidad a la excitotoxicidad mediada por receptores NMDA, produce un incremento de la producción de radicales libres y por lo tanto un aumento del estrés oxidativo (Stack *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Representación esquemática de la neurodegeneración autónoma no celular de la enfermedad de Huntington (Schwarcz, 2010).

La proliferación de células gliales (microglia y astrocitos) en las regiones cerebrales afectadas, lleva a proponer que las células gliales, principalmente la microglía participa de manera importante en la muerte neuronal, debido a que son las responsables de producir y secretar metabolitos tóxicos de la VK la cual está alterada en la EH (Schwarcz *et al.*, 2009). Se especula que la cascada de eventos podría ser iniciada por la expresión de la mhtt, posiblemente en respuesta al daño mitocondrial, es así que las neuronas disfuncionales crean un ambiente pro-inflamatorio que lleva a la activación de la microglía (Schwarcz *et al.*, 2009). La activación de la microglía genera una regulación positiva de la VK potenciando la liberación de 3-hidroxikinurenina (3-HK) y QUIN, los cuales generan la muerte de las ya debilitadas neuronas por una combinación de la excesiva producción de ROS y activación del receptor a NMDA (Schwarcz *et al.*, 2009) (figura 2).

La neurodegeneración observada en la EH es atribuida a diversos factores: la nueva función tóxica de la mhtt, la formación de agregados proteínicos, el aumento del estrés oxidativo y de la sensibilidad de la neuronas a la estimulación del receptor a NMDA entre otros. Aunque no está establecido el orden en el cual ocurre esta serie de eventos, es un hecho que existe una interacción entre uno y otro lo cual finalmente culmina en la muerte de las neuronas.

## ANTECEDENTES

Los modelos de animales transgénicos y con mutación nula son una valiosa herramienta para el estudio del mecanismo de daño de las enfermedades neurodegenerativas. Es así que los estudios de Martínez-Lazcano y colaboradores (2007), mostraron una protección selectiva contra el daño oxidativo en ciertas regiones cerebrales de los ratones deficientes de la nNOS (-/-) en condiciones basales, lo cual ayudaría a explicar algunas de las características fenotípicas.

La participación del NO en los procesos fisiopatológicos de varias enfermedades entre ellas la EH, quedó evidenciado al inhibir farmacológicamente a la NOS o mediante el empleo de modelos con mutación nula. Asimismo se observó que las isoformas de la NOS participan de manera diferencial en el daño cerebral en modelos excitotóxicos de animales, atribuyéndole el daño neuronal principalmente a la nNOS y en menor medida a la eNOS, mientras que no se detectó la participación de la iNOS (Parathath *et al.*, 2007; Brown, 2010). La participación de la nNOS en la isquemia cerebral quedó demostrada también con la inhibición farmacológica de la misma y la resistencia al daño excitotóxico en los ratones con mutación nula (Huang *et al.*, 1994). Lipton y colaboradores (1994), demostraron que la activación excitotóxica de la nNOS genera la S-nitrosilación de ciertas proteínas, que resultan en una disfunción mediada por estrés reticular o la muerte neuronal.

El daño oxidativo evaluado por la medición de peroxidación de lípidos (PL) o formación de ROS es una característica de la EH y de los modelos neuroquímicos de la misma, ya que en los ratones transgénicos de la EH se observó un incremento de la PL correlacionando con el deterioro del fenotipo neurológico (Pérez-Severiano *et al.*, 2000). Evidencias similares fueron demostradas en cerebros post-mortem de la EH, en los que se encontró un incremento del daño oxidativo en la regiones más afectadas (Imarisio *et al.*, 2008). En el modelo de la EH inducido con QUIN se demostró la participación significativa de la NOS en el

daño excitotóxico, donde correlacionó con un daño oxidativo (Santamaría & Ríos, 1991, 1993), ya que incrementa los niveles de PL y formación de ROS disminuyendo las defensas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reducido (GSH) (Pérez-Severiano *et al.*, 2011). Por el contrario la inhibición farmacológica con L-NAME redujo tanto la actividad de la NOS, el daño oxidativo y conductual (Pérez-Severiano *et al.*, 1998). Quedando de manifiesto la participación del NO en el mecanismo neurodegenerativo al demostrar su participación en un modelo transgénico para la EH (Pérez-Severiano *et al.*, 2002).

En estudios *in vivo* la inhibición farmacológica de la nNOS mostró una protección contra la lesión intraestriatal inducida con NMDA pero no contra AMPA (Shulz *et al.*, 1995). De igual manera se demostró que los cultivos de células corticales de ratones con mutación nula nNOS (-/-), son resistentes a la toxicidad mediada por receptores NMDA pero no AMPA (Dawson *et al.*, 1996). La toxicidad inducida con ácido kaínico (KA) en ratones con mutación nula para la nNOS (-/-), mostró que en neuronas hipocámpales no se produjo una neurodegeneración, indicando así que la muerte excitotóxica generada por el KA, es dependiente de la presencia de la nNOS funcional, pero no de las otras dos isoformas (Parathath *et al.*, 2011). La disparidad existente entre los resultados podría deberse a las diferencias de los métodos utilizados para lograr la excitotoxicidad.

Ayata y colaboradores (1997) muestran una reducción de los niveles de las proteínas nitradas, radicales  $\cdot\text{OH}$  y fragmentación del ADN, como medidas indirectas de la formación de  $\text{ONOO}^-$ , posterior a la lesión intraestriatal con NMDA en ratones con mutación nula nNOS (-/-). Por otro lado está demostrado que el exceso de NO producido por un evento excitotóxico genera la sobreactivación de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), la cual se activa en respuesta al daño a ADN causando la muerte neuronal por falla energética (Brown, 2010). Estos resultados se confirmaron empleando ratones con mutación nula nNOS (-/-) donde se observó que existe una disminución de la activación de PARP, posterior a un

evento de isquemia cerebral, sugiriendo que un evento isquémico activa la nNOS para producir ONOO<sup>-</sup> el cual activa a la PARP (Endres *et al.*, 1998).

Al igual que la excitotoxicidad, la pérdida de la función de la proteína htt podría participar en la neurodegeneración selectiva de la EH. En estudios *in vivo* se observó la proteólisis de htt mediada por la caspasa-3 y neurodegeneración apoptótica tras la estimulación de los receptores NMDA en el cuerpo estriado (Leavitt *et al.*, 2006). Los estudios realizados por el grupo de Leavitt (2006) muestran que la htt posee una función neuroprotectora *in vivo*, y que los niveles de htt modulan la sensibilidad de las neuronas a la apoptosis mediada por la excitotoxicidad asociada a receptores NMDA. En modelos transgénicos de la EH y en cultivos celulares se observó que la mhtt causa el incremento de la respuesta neuronal a la estimulación glutamatérgica (Leavitt *et al.*, 2006).

Al respecto está reportada la inducción de la inmunoreactividad de la htt en las neuronas estriatales de 4 a 6 horas después de la inyección con QUIN (Tatter *et al.*, 1995). En el mismo sentido el grupo de Carlock (1995), reporta un aumento en la expresión del gen *htt* desde 1-12 horas después de la lesión intraestriatal con QUIN. Lo cual sugiere que el aumento tanto en la expresión del ARN mensajero, como de la proteína htt en respuesta a la sobreestimulación de los receptores NMDA, podría tener una participación importante en el desarrollo de la EH (Carlock *et al.*, 1995). Siendo así que la aparente especificidad neuronal en el incremento de la htt durante la respuesta aguda al evento excitotóxico podría proveer una explicación parcial para la degeneración específica observada en la EH (Tatter *et al.*, 1995).

## **JUSTIFICACIÓN**

El estrés oxidativo generado por la sobreproducción del NO es un factor importante en la fisiopatología de los trastornos neurodegenerativos. Lo que lleva a proponer que la neurodegeneración excitotóxica asociada a receptores NMDA es un factor crítico en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas y en particular de la EH. Por lo que la utilización de un modelo con mutación nula para la nNOS provee de una valiosa herramienta para el estudio de la participación del NO en la fisiología o patofisiología de estos trastornos. Dado que a la fecha no está estudiado el daño oxidativo inducido por QUIN en los ratones con mutación nula para la nNOS, y no existe un análisis de cambios en la expresión del gen de la htt. El estudio de estos dos puntos en el daño generado por QUIN, en el modelo de ratones con mutación nula para la nNOS(-/-), nos permitirá entender mejor los procesos de daño en el modelo experimental de la EH.

## **HIPOTESIS**

El daño oxidativo inducido por QUIN en el cuerpo estriado del ratón con mutación nula nNOS (-/-) estará disminuido; por el contrario la expresión del gen de la htt estará aumentado en los ratones lesionados intraestriatalmente con QUIN.

# OBJETIVOS

## General

Estudiar la participación de la sintasa del óxido nítrico en el daño oxidativo inducido por QUIN en ratones con mutación nula para la nNOS. Paralelamente observar si el gen de la huntingtina presenta cambios en su expresión posterior a la excitotoxicidad por QUIN.

## Particulares

Evaluar el daño neuronal inducido por QUIN en los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS (-/-).

Evaluar el estado oxidativo inducido por QUIN en los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS (-/-).

Cuantificar la actividad y determinar el nivel de expresión de las NOS inducida por QUIN en los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS (-/-).

Analizar la expresión del gen de la htt después de la lesión con QUIN en los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS (-/-).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

La colonia de ratones con mutación nula para la nNOS fue iniciada a partir de tres ratones machos de la línea B6,129-Nos1<sup>tm1P1h</sup>, homocigotos con mutación nula nNOS(-/-) (Huang *et al.*, 1993) provenientes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, EUA) y 6 ratones hembras homocigotos nNOS (+/+) de la cepa B6CBA.

### Identificación del genotipo de los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS

Los ratones de la colonia con mutación nula para la nNOS siguen una herencia mendeliana, por tanto se formaron 3 grupos con distintos genotipos de acuerdo a las cruces a realizar: ratones homocigotos silvestres nNOS (+/+), heterocigotos nNOS (+/-) y homocigotos con mutación nula nNOS (-/-).

Para la identificación de estos grupos se realizó la siguiente metodología:

**Extracción del ADN.** A la edad de 4-5 semanas, se realizó una biopsia de oreja para obtener el ADN genómico de cada ratón. Se utilizaron 475 µL de una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.312%) más 25 µL de proteinasa K (20 mg/mL), la cual se incubó durante 6 hrs como mínimo para la digestión del tejido y liberación del ADN. La purificación del ADN se realizó con 500 µL de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar el tejido no digerido y las proteínas. Cada muestra fue agitada vigorosamente y centrifugada durante 5 minutos a 14, 000 rpm (25°C); terminado este procedimiento se tomaron 400 µL de la fase acuosa (superior) y se transfirieron a una microfuga estéril. El aislamiento del ADN se realizó en dos pasos: 1) se agregaron, 400 µL de isopropanol a 4°C, la muestra se agitó vigorosamente y centrifugó durante 5 minutos a 14, 000 rpm (4°C); 2) con 1 mL de alcohol etílico al 70 % repitiendo las condiciones de centrifugado. Posteriormente el ADN obtenido fue solubilizado en 100 µL de una solución de TE (Tris 1 M, pH 7.6 y EDTA 0.5 M).

**Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** La identificación del genotipo se realizó mediante una (PCR), se amplificaron fragmentos de los genes de nNOS y NEO (gen de resistencia a neomicina) utilizando dos pares de oligonucleótidos: IMR0406 5' TCAGATCTGATCCGAGGAGG y IMR0407 3' CGATACTGTCGCGAGACCTT, que reconocen la secuencia del primer exón de la nNOS y IMR0013 5' CTTGGGTGGAGAGGCTATTC y IMR0014 3' CTAGAGGACAGTAGAGTGGA, que identifican un fragmento del gen NEO. Las condiciones utilizadas para un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L por PCR estuvo constituida por 2.4  $\mu$ L de una solución amortiguadora 10X (KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.0); 0.8  $\mu$ L de los oligómeros IMR0013 y IMR 0014 y 1.2 $\mu$ L de IMR0406 y IMR0407; 5  $\mu$ L (100-150 ng) del ADN extraído de la biopsia de oreja; 2.4  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 1.92  $\mu$ L de dNTPs (25 mM); 0.12  $\mu$ L de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L), 9.16  $\mu$ L de agua inyectable estéril. Además, se realizaron dos reacciones independientes, una como control negativo con 1  $\mu$ L de agua inyectable y otra como control positivo con 1  $\mu$ L de plásmido pLNCX, que contiene el gen de resistencia a la neomicina. Las condiciones para la amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 2 minutos.

Los productos obtenidos por PCR tienen un tamaño de 117 pares de bases, para el gen de nNOS y 280 pares de bases para el gen de NEO. El control positivo de la reacción fue llevado a cabo con el plásmido pLNCX. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 3% y éste fue teñido con 3  $\mu$ L de una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL). Para observar el ADN amplificado de cada ratón con luz U.V. fueron depositados 12  $\mu$ L de cada reacción, más 3  $\mu$ L de una solución de carga en cada pozo y se corrió durante 30 min a 100 V.

**Lesión estereotáxica con QUIN para generar el modelo de excitotoxicidad.** Bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico a una dosis de 70 mg/kg i.p. los ratones fueron colocados en un aparato estereotáxico para inyectar 1  $\mu$ L de QUIN (30 nmol/ $\mu$ L) en el cuerpo estriado del hemisferio derecho, usando las siguientes

coordenadas: 0.6 mm anterior, -2.2 mm lateral a bregma y -2.6 mm ventral a la duramadre (Petersén *et al.*, 2001).

### **Determinación del daño oxidativo**

La medición del estado oxidativo, se realizó mediante la cuantificación de la peroxidación de lípidos (PL) y la formación de ROS en el cuerpo estriado de los ratones homocigotos con mutación nula nNOS (-/-), heterocigotos nNOS(+/-) y homocigotos silvestres nNOS(+/+), para lo cual fue extraído y disectado el cuerpo estriado del hemisferio derecho a las 2 horas después de la inyección con QUIN.

**Cuantificación de la peroxidación de lípidos.** Se siguió la técnica descrita por (Triggs & Willmore, 1984). El cuerpo estriado del hemisferio derecho fue homogenizado en 2.2 mL de solución salina. A un mL de dicho homogenado se le adicionó 4 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v). Después la mezcla fue refrigerada por 30 minutos para permitir la separación de las fases, siempre protegida de la luz. La fase acuosa (fase superior) se aspira con una bomba de vacío. Finalmente fueron transferidos 2 mL de la fase orgánica (clorofórmica) a una celda de cuarzo y se agregaron 200  $\mu$ L de metanol. La muestra fue analizada usando un espectrofotómetro de fluorescencia a longitudes de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Los resultados son reportados como unidades relativas de fluorescencia por mg de proteína (Ríos & Santamaría, 1991; Pérez-Severiano *et al.*, 2000).

**Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno.** La formación de especies reactivas de oxígeno fue evaluada utilizando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), el cual es oxidado por acción de las ROS para formar 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), la cual es capaz de generar fluorescencia (Ali *et al.*, 1992).

Cinco  $\mu$ L del homogenado antes utilizado en la PL fueron mezclados con 45  $\mu$ L de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) (TRIS pH 7.4: solución HEPES conteniendo NaCl 120 mM, KCl 2.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mM,  $\text{MgCl}_2$  0.1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  5

mM, glucosa 6.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.0 mM, HEPES 10.0 mM). A partir de esta mezcla se tomaron 5 µL los cuales se incubaron con 145 µL de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) y 50 µL de DCF-DA 50 µM a 37°C durante 1 hora con agitación constante en una placa de 96 pozos. Posteriormente se realizó la determinación de la fluorescencia de cada muestra en un multi-lector de placa FLx800 (Biotek instruments, Inc.), a una longitud de onda de 488 nm de excitación y 525 nm de emisión. Los valores obtenidos fueron calculados a partir de la interpolación en una curva de calibración de diclorofluoresceína DCF 100 nM ajustada por el método de mínimos cuadrados. Los valores de proteínas de cada muestra se utilizaron para expresar los resultados como nmoles de DCF /mg proteína/min.

### **Determinación del daño neuronal**

**Cuantificación de la conducta de giro.** La medición del daño neuronal inducido por QUIN, se realizó mediante la cuantificación de la conducta de giro. Tres días después de realizar la lesión intraestriatal con QUIN se administró de forma intraperitoneal R-(-)-apomorfina (1 mg/kg), cada ratón fue colocado en una caja de policarbonato (25X40X20 cm) y se cuantificó durante 30 minutos el número de giros ipsilaterales.

**Determinación de los niveles de GABA por CLAR (Cromatografía de líquidos de alta resolución).** Cuatro días después de la lesión estriatal, los ratones fueron administrados con un inhibidor de la glutamato descarboxilasa (GAD; enzima paso limitante en la síntesis de GABA), el ácido 3-mercaptopropiónico (0.25 mmol/kg i.p.) para inhibir el incremento de GABA *post mortem*. Dos minutos después, los animales se sacrificaron por decapitación y se realizó la extracción del tejido estriatal. El contenido estriatal de GABA, se determinó por CLAR (Sistema Agilent serie 1100 con una columna Alltech-adsorbosphere, OPA-HS, tamaño de partículas de 5 µm y de 100 mm largo X 4.6 mm de diámetro interno), utilizando el método modificado de Pérez-Neri y colaboradores (2007). El cuerpo estriado fue homogenizado en 50 volúmenes de una solución de metanol grado HPLC al 85%

(v/v), utilizando un procesador ultrasónico (130 W, 40% amplitud, 15 s, 2 ciclos), los homogenados se centrifugaron a 14, 000 rpm por 15 minutos a 4°C y 10 µL del sobrenadante obtenido se inyectaron al sistema para su análisis, utilizando detector de fluorescencia a 232 nm de excitación y 455 nm de emisión, realizando una derivatización pre-columna con o-ftalaldehido-mercaptoetanol. El programa de gradiente para el análisis cromatográfico se encuentra en la tabla 1. Los cromatogramas se integraron y procesaron utilizando el software ChemStation de Agilent, Rev. 10.02.

**Tabla 1.** Programa de gradiente para el análisis por CLAR

<b>Flujo 1.5 mL / min</b>			
	<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A (MeOH)</b>	<b>% B (Buffer de Acetatos)</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>78</b>
<b>2</b>	<b>12</b>	<b>35.9</b>	<b>64.1</b>
<b>3</b>	<b>12.1</b>	<b>99</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>15</b>	<b>99</b>	<b>1</b>

### **Análisis del sistema nitrérgico**

**Determinación de la participación de la NOS.** La participación del NO en el daño oxidativo fue cuantificado indirectamente mediante la técnica descrita por Bredt & Snyder (1990), la cual mide la actividad de la NOS evaluando la conversión de L-arginina a L-citrulina más NO. Cada muestra fue homogenizada en 150 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas disueltos en una solución reguladora (50 mM de Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM EGTA, con 0.1% (v/v) β-mercaptoetanol a pH de 7.5). La solución final de inhibidores se preparó obteniendo las siguientes concentraciones finales 100 mM de leupeptina, 1 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) a partir de una solución patrón de 100 mM

disuelto en etanol, 2 mg/mL de aprotina, 10 mg/mL de inhibidor de tripsina de soya y 0.1 % (v/v) de noninet-40. Posteriormente cada muestra con un contenido de 500 µg de proteína se incubó durante 30 min a 37°C en presencia de los siguientes cofactores (todos a concentraciones finales en un volumen máximo de reacción de 100 µL): 1 mM NADPH, 100 nM de calmodulina, 30 µM de tetrahidrobiopterina y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>. La mezcla de reacción contuvo 10 µM L-arginina-HCl y 0.2 µCi de L-arginina (Amersham, aproximadamente 41 Ci/mmol). Los volúmenes finales de reacción fueron ajustados a 100 µL con una solución reguladora. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de una solución amortiguadora de paro (2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH=5.5). La mezcla de reacción (volumen final de 1.1 mL), fue transferida a una columna de intercambio iónico que contenía 1 mL de resina, la cual retiene la L-arginina y permite que la L-citrulina sea eluida, con 1 mL de agua bidestilada durante 10 min, a través de la columna; posteriormente, a cada eluyente de la mezcla de reacción se le adicionaron 5 mL de líquido de centelleo Aquasol-2, para la cuantificación de la radiactividad se utiliza un contador de centelleo. La actividad enzimática se expresa como ng de L-citrulina/500 µg de proteína/ min.

**Determinación de la expresión de la iNOS, eNOS y nNOS por "Western blot".** A partir del homogenado utilizado para la determinación de la actividad de las isoformas de la NOS (la cual contenía inhibidores de proteasas y cuya concentración de proteínas fue evaluada previamente), se toma un volumen correspondiente a 50 µg de proteína de cada muestra y se mezcló con un volumen igual de solución amortiguadora de Laemmli que contiene (4% SDS, 20% glicerol, 2% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-Hcl, pH 6.8). La desnaturalización de las proteínas se realizó mediante un baño de agua en ebullición durante 3 minutos, cada muestra se depositó en un pozo de un gel de poliacrilamida con SDS al 8%. La electroforesis se llevó a cabo a 140 V, durante 1 hora, después se realizó la transferencia a una membrana de PVDF a 110 mA, con el sistema de electrotransferencia semiseco durante 45 minutos. El bloqueo

de proteínas inespecíficas se hizo con una mezcla de leche descremada al 5% disuelta en PBS 1X (0.14 M NaCl, 2.75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 12.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4)-Tween 0.05%, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección de las proteínas se realizó incubando por separado con los anticuerpos primarios nNOS, eNOS e iNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc.) a una dilución 1:300, durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Posteriormente se lavó varias veces con 10 mL PBS-Tween 0.05%. En seguida, se agregó el anticuerpo secundario (peroxidasa anti-ratón 1:3000 o anti conejo en una relación de 1:6000) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación constante. Terminando el tiempo de incubación se lavó varias veces con PBS Tween. La detección de las proteínas se realizó con un reactivo que genera quimioluminiscencia (NEN™ Life Science Products) y se utilizó una película Kodak (X-OMAT). Las imágenes fueron capturadas usando un instrumento BIODOC-it System (UVP) y el análisis de densitometría se realizó usando el programa Lab Works™ 4.0 *Image Acquisition and Analysis Software* (UVP). Después de realizar el análisis densitométrico, los resultados (normalizados con la expresión de actina) fueron expresados como unidades arbitrarias de densidad óptica (DO).

### **Determinación de la expresión del gen de la htt.**

La determinación de la expresión del gen que codifica para la htt se realizó con la extracción del ARN mensajero y la amplificación del gen *htt* mediante PCR en el cuerpo estriado, 2 horas después de la inyección con QUIN de los ratones homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos con mutación nula nNOS (-/-).

La extracción del ARN se realizó homogenizando el tejido con 500 µL Tripure (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al homogenizado se le añadieron 200 µL de cloroformo, fue agitado suavemente durante 30 segundos, y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4°C, 18 minutos a 14 000 rpm. Se transfirió aproximadamente el 75% de la fase acuosa incolora (superior) a un tubo limpio. Para la purificación y aislamiento, se añadieron 500 µL de isopropanol a 4°C, se

agitó mediante inversión varias veces y se incubó durante 20 minutos. Dicha mezcla se centrifugó 10 minutos a 13 000 rpm (4°C). El sobrenadante se decantó y desechó, para posteriormente añadir 500 µL de etanol al 75%, se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm (4°C). Al finalizar el centrifugado el sobrenadante se decantó y desechó, se permitió que el botón seicara por evaporación durante 5 minutos para después añadir 200 µL de agua DEPC.

La concentración del ARN se estimó en un espectrofotómetro de UV a 240 nm

**Síntesis del ADN complementario (ADNc).** Se tomaron 5 µg de ARN total y se le añadieron 2 µL de oligo dT y se incubó con las siguientes condiciones: 10 minutos a 65°C, 5 minutos a 4°C. Finalizado este proceso se agregaron 10 µL de una mezcla que contenía 2.4 µL de agua DEPC, 4 µL de regulador 5x, 0.8 µL de M-MLVRT (200 U/ µL), 0.8 µL dNTP's (10 mM) y 2 µL de DTT (100 mM). La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora y 5 minutos a 95°C. Finalmente se añadieron 80 µL de agua DEPC.

**Expresión del ARN mensajero del gen *htt*.** La determinación de la expresión del gen *htt* se realizó mediante una (PCR) con la amplificación de los fragmentos del gen *htt* utilizando el par de oligonucleótidos: sentido *htt1* 5' GGGGTGACACGGAAAGAAAT y antisentido *htt2* 3' TCAGTGCTTGCAGGAGTTCA (Doruet *et al.*, 2009) que reconocen la secuencia del décimo exón de la *htt* y como control, un par de oligonucleótidos que identifica un fragmento del gen de actina: ACT1 sentido 5'CTTGGGTGGAGAGGCTATTC y ACT2 antisentido 3'CTAGAGGACAG-TAGAGTGGA. Las condiciones utilizadas para un volumen final de reacción de 25 µL por PCR estuvo constituida por 2.4 µL de una solución amortiguadora 10X (KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.0); 1 µL de los oligómeros *htt1* y *htt2* y 1 µL de ACT1 y ACT2; 5 µL del cDNA sintetizado; 2.4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 1.92 µL de dNTPs (25 mM); 0.12 µL de Taq polimerasa (5 U/µL), 9.16 µL de agua inyectable estéril. Además, se realiza una reacción independiente, como control negativo con 1 µL de agua inyectable. Las

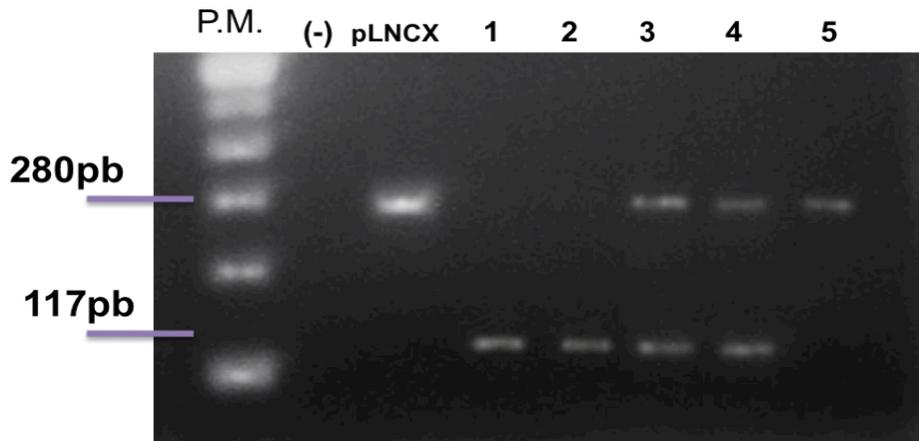
condiciones para la amplificación son: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 45 ciclos a 95°C por 8 minutos; 68°C, 5 minutos; 72°C, 8 minutos y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 2 minutos. Los productos obtenidos por PCR tienen un tamaño de 175 pares de bases para el gen *htt* y 200 pares de bases para el gen de actina. Los productos amplificados fueron analizados de la manera indicada anteriormente.

### **Análisis estadístico**

Los valores obtenidos de cada experimento fueron analizados por una prueba estadística de ANOVA o ANOVA de dos vías, para detectar diferencias entre los grupos. Para los experimentos donde se encontró una diferencia significativa se prosiguió con una prueba de Tukey.

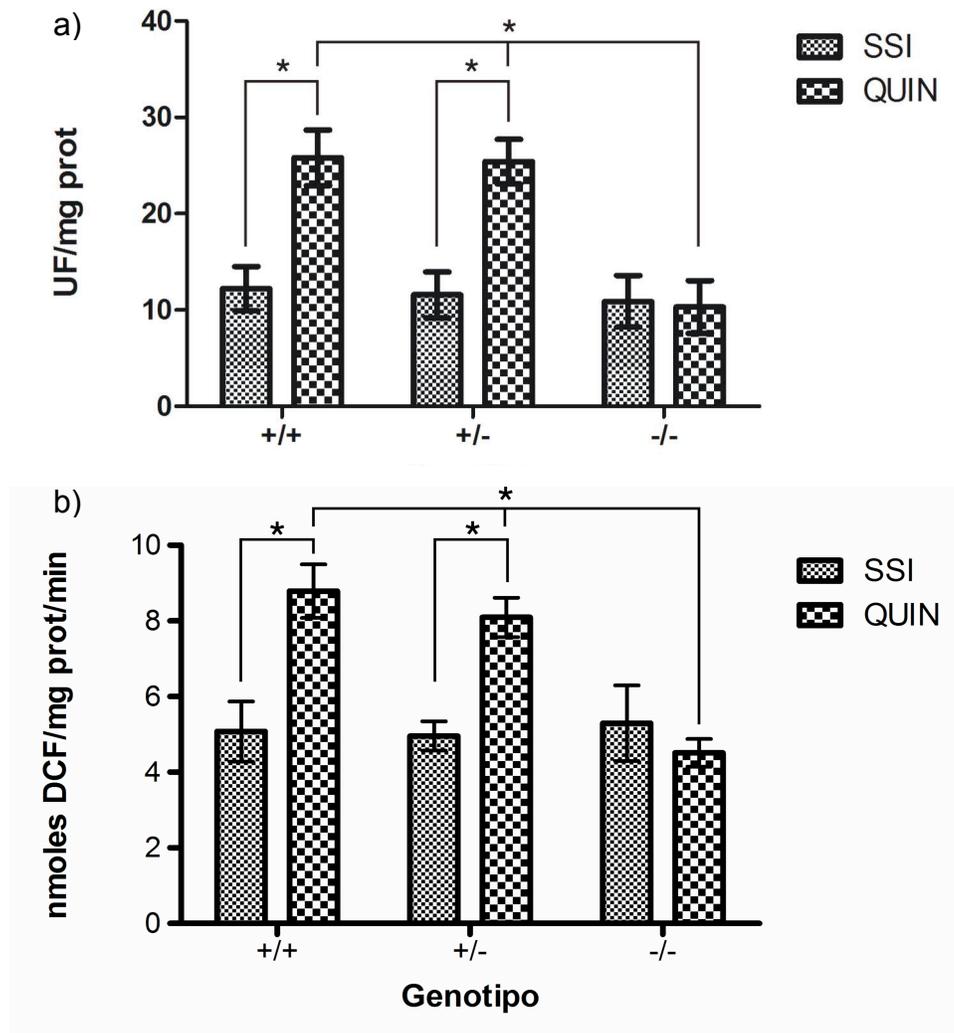
## RESULTADOS

La identificación del genotipo de cada ratón por PCR a la edad de 4-5 semanas se inició con la extracción del ADN a partir de una biopsia de la oreja de cada ratón. De cada generación de animales, identificamos las poblaciones de homocigotos nNOS (+/+), heterocigotos nNOS (+/-) y homocigotos con mutación nula para la nNOS (-/-) (Figura 3). Todos los animales obtenidos de los diferentes genotipos, se emplearon en los experimentos de determinación del daño neuronal y estado oxidativo, cuantificación de la actividad y expresión de las NOS, y para la identificación del gen de la htt.



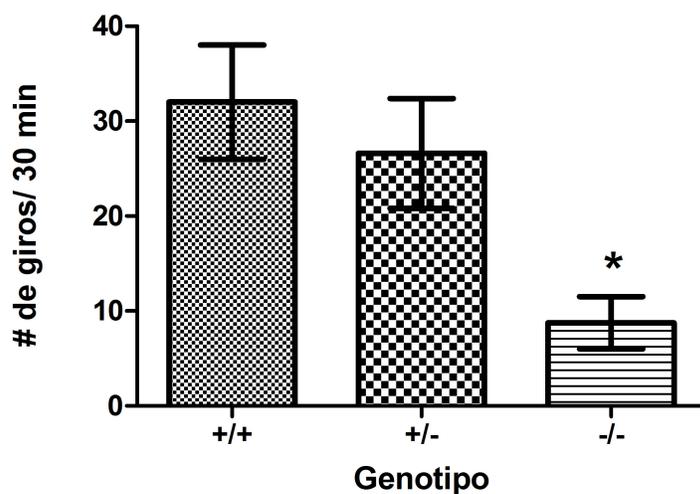
**Figura 3.** Productos amplificados por PCR para la determinación de genotipo de los ratones con mutación nula para la nNOS. Los fragmentos de 280 y 117 pb correspondientes al exón 1 de la nNOS y el gen de resistencia a neomicina (NEO) respectivamente. Donde P.M. indica el marcador de peso molecular (pb; pares de bases), (-) es el control negativo de la reacción y pLNCX el control positivo. Los carriles 1 y 2 corresponden a ratones homocigotos nNOS (+/+), 3 y 4 a ratones heterocigotos nNOS (+/-) y 5 a un ratón homocigoto con mutación nula nNOS (-/-).

Para evaluar el daño oxidativo inducido por QUIN, se determinó la peroxidación de lípidos (PL) y la formación de ROS dos horas después de la microinyección estriatal con QUIN. Los ratones homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-) lesionados con QUIN ( $25.803 \pm 2.878$ ,  $25.416 \pm 2.317$  UF/mg prot.) muestran un aumento significativo en la PL con respecto a sus testigos ( $12.231 \pm 2.298$ ,  $11.574 \pm 2.375$  UF/mg prot.) administrados intraestriatalmente con SSI. Sin embargo los ratones con mutación nula nNOS (-/-) lesionados con QUIN ( $10.313 \pm 2.724$  UF/mg prot.) no mostraron diferencias significativas con respecto a su testigo ( $10.897 \pm 2.69$  UF/mg prot.). Los ratones testigos de los 3 diferentes genotipos no muestran diferencia significativa entre sí. En resumen, los ratones con mutación nula nNOS (-/-) mostraron una reducción significativa de ~60% en comparación con sus hermanos homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-) (Figura 4a). Resultados similares se obtuvieron de la determinación de la formación ROS, donde los ratones homocigotos con mutación nula nNOS (-/-) ( $4.513 \pm 0.366$  nmoles de DCF/mg prot/min) mostraron una disminución de la formación de ROS con respecto a sus hermanos ( $8.789 \pm 0.707$ ,  $8.093 \pm 0.0519$  nmoles de DCF/mg prot/min) homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-) respectivamente. (Figura 4b).



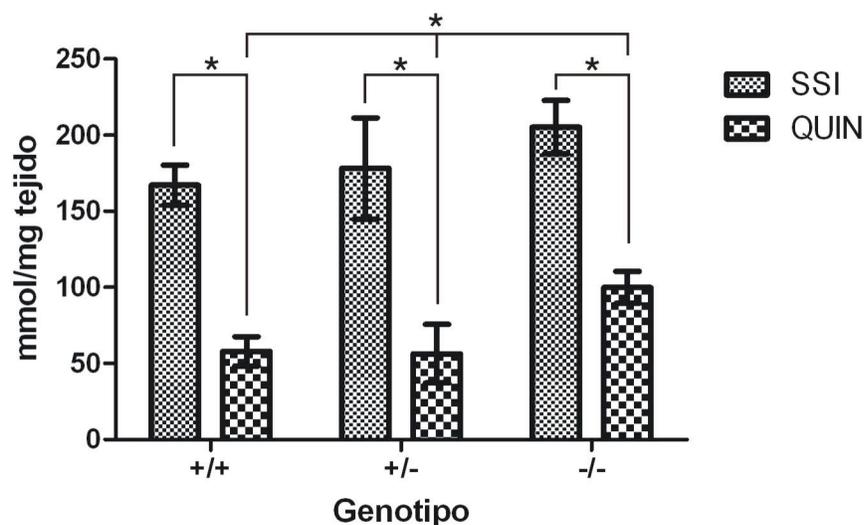
**Figura 4.** Daño oxidativo en el cuerpo estriado de los ratones homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos con mutación nula nNOS (-/-), dos horas después de la inyección con solución salina isotónica (SSI) o ácido quinolínico (QUIN). a) Peroxidación de lípidos, b) especies reactivas de oxígeno (ROS). Cada barra representa la media  $\pm$  ES (n=3-6), ANOVA de dos vías, *post hoc* Tukey, \*p<0.05.

Para evaluar el daño neuronal inducido por la inyección intraestriatal con QUIN se cuatificó la conducta de giro. La administración de apomorfina a los ratones resulta en la manifestación de la conducta de giro contralateral al hemisferio dañado (Ungerstedt, 1971). La velocidad y el número de giros es proporcional al grado de la lesión. Los ratones homocigotos con mutación nula nNOS (-/-) mostraron una disminución significativa de ~80% con respecto a sus hermanos homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-), mientras que los otros dos grupos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 5).



**Figura 5.** Giros ipsilaterales 3 días después de la inyección con ácido quinolínico (QUIN) de los ratones homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y con mutación nula para la nNOS (-/-). Cada barra representa la media ± ES (n=3-6), ANOVA \*p<0.05.

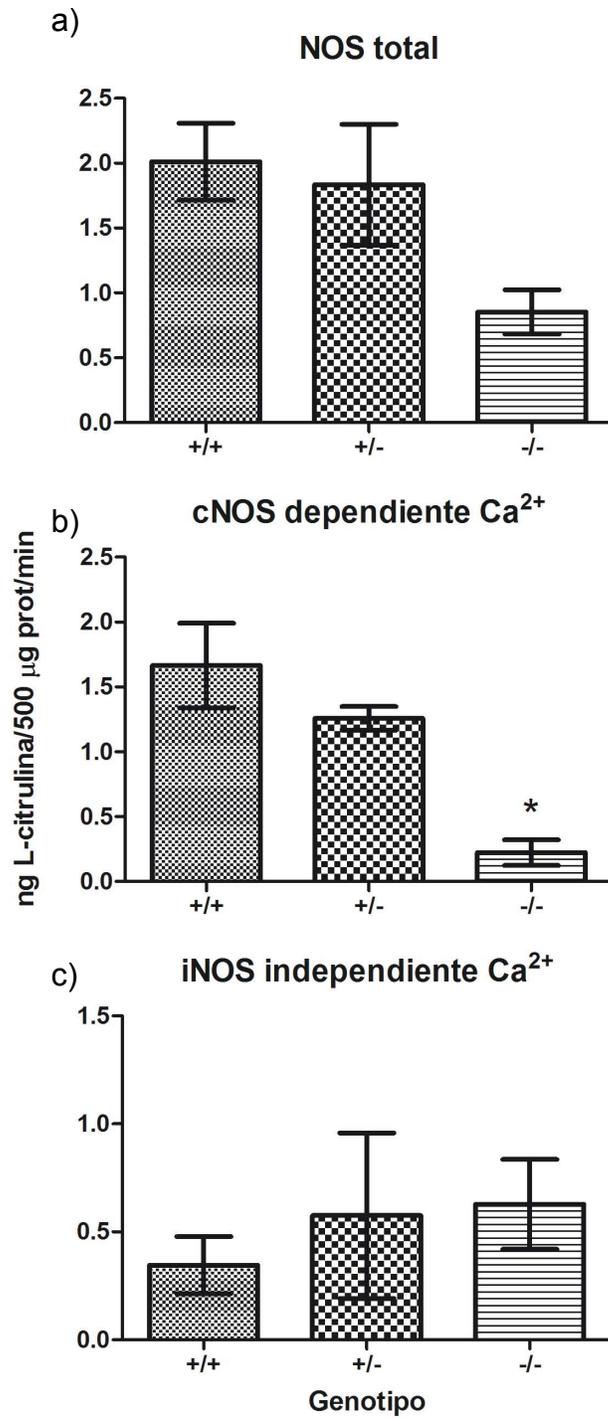
Como marcador neuroquímico del daño neuronal se cuantificaron los niveles de GABA en el estriado después de la inyección intraestriatal con QUIN. Los ratones de los 3 genotipos microinyectados con QUIN mostraron una disminución significativa de los niveles de GABA con respecto a los controles. Sin embargo la disminución de los niveles de GABA fue significativamente menor en los ratones con mutación nula nNOS (-/-) con respecto a los genotipos homocigoto (+/+) y heterocigoto (+/-) lesionados intraestriatalmente con QUIN (Figura 6).



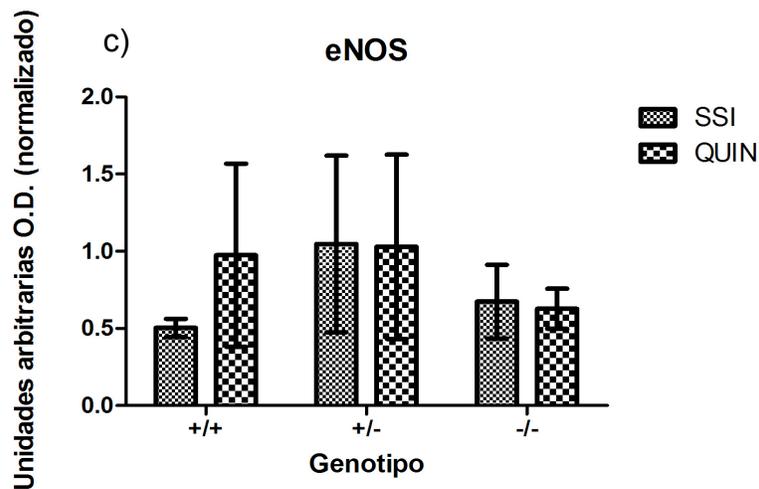
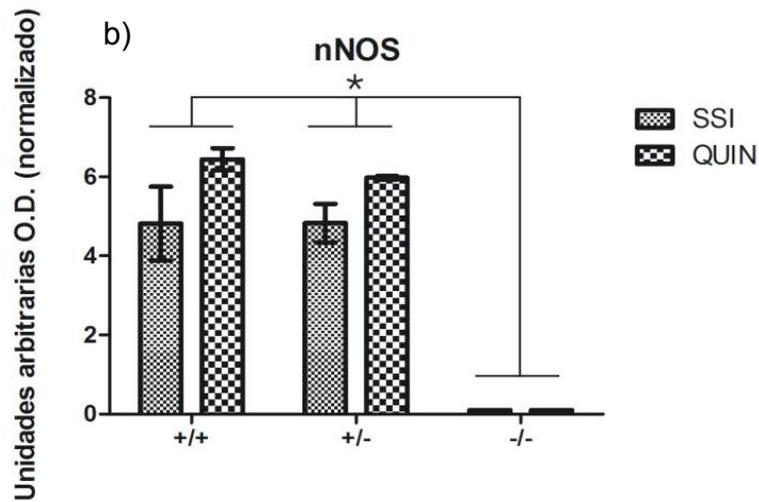
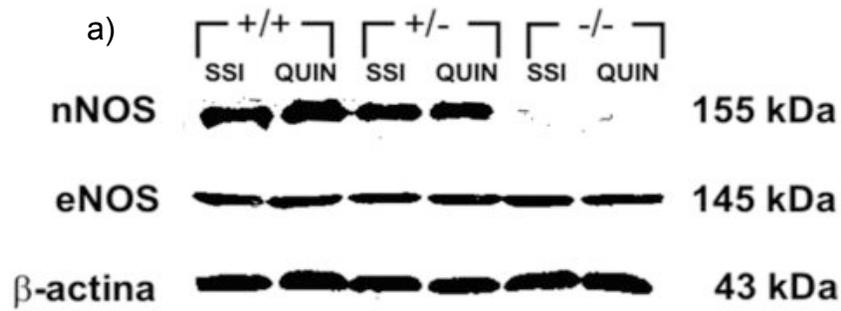
**Figura 6.** Niveles de GABA de los ratones homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos con mutación nula nNOS (-/-), 3 días después de la lesión con solución salina isotónica (SSI) o ácido quinolínico (QUIN). Cada barra representa la media  $\pm$  ES (n=3-6), ANOVA de dos vías, post hoc Tukey, \*p<0.05

Para evaluar la participación del NO en la neurotoxicidad inducida por QUIN, se cuantificó la actividad de las NOS total, NOS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y NOS independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cuerpo estriado, 2 horas después de la microinyección con QUIN. Los ratones con mutación nula nNOS (-/-) mostraron una disminución en la actividad total de la NOS en comparación con sus hermanos homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-) (Figura 7a). En la actividad de las NOS constitutivas dependientes de calcio, los ratones con mutación nula nNOS (-/-) muestran una disminución significativa con respecto a sus hermanos (Figura 7b), mientras que la actividad de la NOS independiente de calcio fue baja en comparación con la constitutiva y similar los 3 genotipos (Figura 7c).

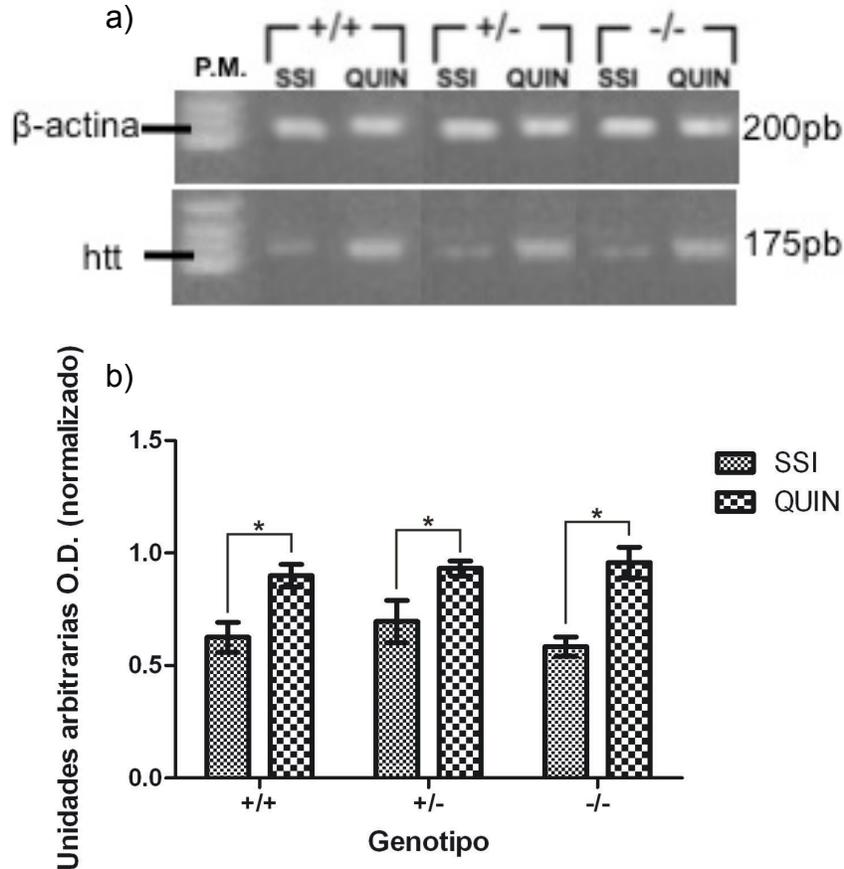
La expresión de la isoforma nNOS muestra un aumento en los ratones homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-) tratados con QUIN con respecto a los testigos (Figura 8a y b). En los ratones con mutación nula para la nNOS (-/-) no se detectó la expresión de esta isoforma (Figura 8a y b). La expresión de la isoforma eNOS no mostró diferencias entre los 3 diferentes genotipos y los dos tipos de tratamiento (Figura 8a y c). La isoforma iNOS no fue detectable en ninguno de los 3 genotipos.



**Figura 7.** Actividad a) total, b) constitutiva dependiente de Ca<sup>2+</sup>, c) independiente de Ca<sup>2+</sup>, de la NOS en el cuerpo estriado, 2 horas después de la lesión con QUIN, de los ratones homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos con mutación nula nNOS (-/-). Cada barra representa la media ± ES (n=4), ANOVA \*p<0.05



**Figura 8.** Expresión de las isoformas de la NOS en el cuerpo estriado dos horas después de la inyección con solución salina isotónica (SSI) o ácido quinolínico (QUIN). a) Detección de la expresión de las isoformas nNOS, eNOS y  $\beta$ -actina. Análisis densitométrico de la nNOS (b) y eNOS (c). Cada barra representa la media  $\pm$  ES (n=3), ANOVA de dos vías *post hoc* Tukey, \*p<0.05.



**Figura 9.** Expresión del gen *htt* en el cuerpo estriado 2 horas después de la inyección con solución salina isotónica (SSI) o ácido quinolínico (QUIN). a) Expresión y detección del gen *htt* y  $\beta$ -actina. b) Análisis densitométrico de la expresión del gen *htt* normalizado por  $\beta$ -actina. Cada barra representa media  $\pm$  ES (n=3), ANOVA *post hoc* Tuckey, \*p<0.05.

La expresión del gen *htt* de los ratones inyectados intraestriatalmente con SSI y QUIN no muestran cambios significativos entre los 3 distintos genotipos. Pero si existe un aumento de la expresión de gen *htt* al comparar los ratones lesionados con QUIN (homocigotos (+/+) 0.899 $\pm$ 0.050, heterocigotos (+/-) 0.931 $\pm$ 0.033, homocigotos (-/-) 0.957 $\pm$ 0.068) con respecto a los lesionados con SSI (homocigotos (+/+) 0.625 $\pm$ 0.066, heterocigotos (+/-) 0.695 $\pm$ 0.094, homocigotos(-/-) 0.584 $\pm$ 0.042) (Figura 9).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La función del NO en procesos biológicos del sistema nervioso central y periférico, resulta ser de interés en varias áreas de investigación. El NO está involucrado en diferentes procesos fisiológicos como la plasticidad sináptica, neuromodulación y relajación del músculo liso (Calabrese *et al.*, 2007). Pero si el NO es producido en exceso se le asocia con procesos patológicos como las enfermedades neurodegenerativas y eventos de excitotoxicidad (Pérez-Severiano *et al.*, 1998; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007; Calabrese *et al.*, 2007).

Es de gran importancia la comprensión de las funciones del NO en el cerebro, así como su participación en las enfermedades neurodegenerativas. Para ello se emplean herramientas farmacológicas las cuales nos ofrecen una primera aproximación hacia la comprensión de la función de esta molécula, pero para definir claramente la función de cada una de las isoformas de la NOS, la utilización de organismos con mutación nula nos ofrece una mejor aproximación.

El NO está implicado en la neurotoxicidad por daño oxidativo, principalmente por la formación de peroxinitrito, un metabolito altamente reactivo que daña componentes celulares (Mukhopadhyay *et al.*, 2009; Brown, 2010). Por ello consideramos relevante determinar las consecuencias de la falta de la nNOS en el estado oxidativo después de la lesión con QUIN como un modelo neuroquímico de la EH.

Los ratones con mutación nula para la nNOS fueron descritos por el grupo de Huang (1993), donde muestran bajos niveles de la actividad de la NOS y características fenotípicas como alargamiento del estómago y conducta agresiva entre otras. Posteriormente se caracterizó el estado oxidativo en los ratones con mutación nula para la nNOS desde las 12 hasta las 35 semanas de edad, en dicho estudio se encontró que existe una protección selectiva contra el daño oxidativo en el cerebro del ratón con mutación nula nNOS (-/-), particularmente en el cerebelo (Martínez-Lazcano *et al.*, 2007). Esta protección selectiva contra el daño oxidativo podría participar determinando la susceptibilidad contra distintos daños cerebrales.

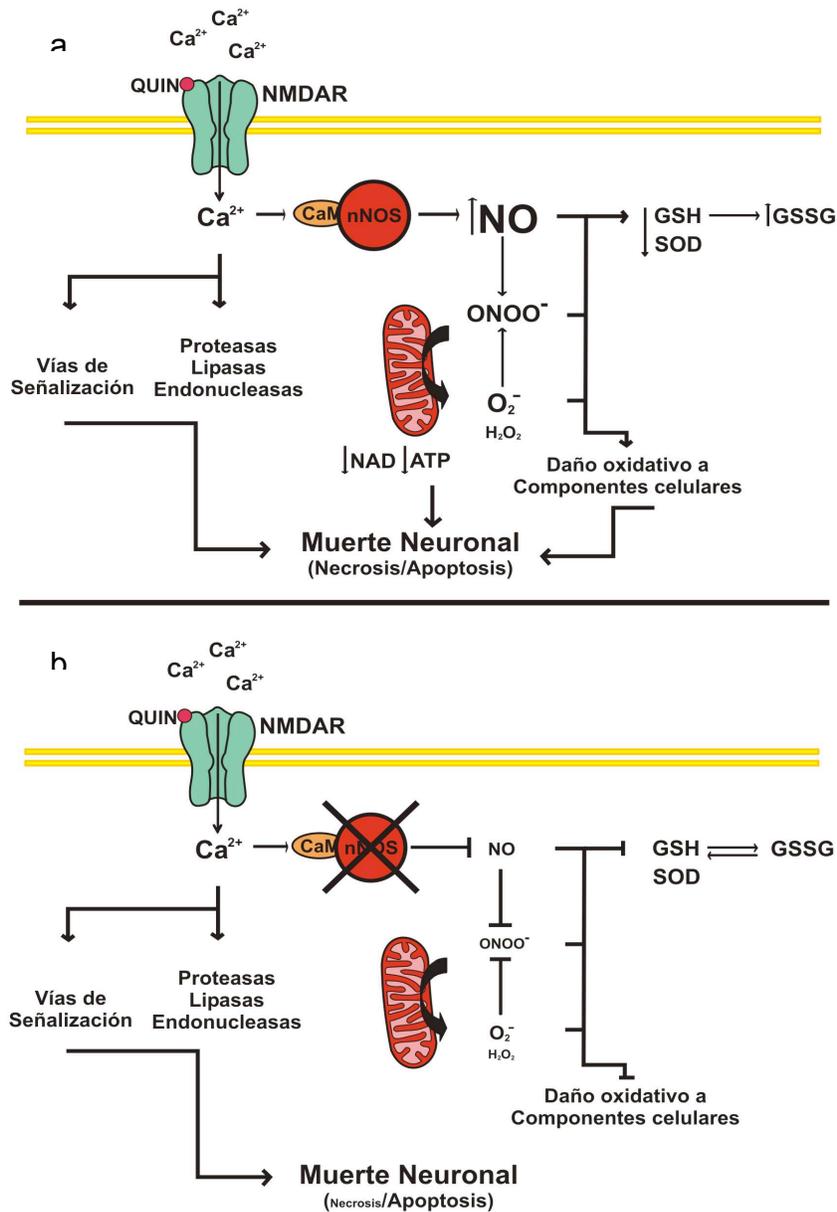
Recientemente se estableció la colonia de ratones con mutación nula para la nNOS, y se realizó la genotipificación mediante PCR lo cual nos permitió identificar ratones con los 3 distintos genotipos: homocigotos (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos con mutación nula nNOS (-/-). Los ratones de la colonia mostraron una frecuencia mendeliana, y los 3 distintos genotipos fueron viables y fértiles, además de presentar las características fenotípicas ya descritas por Martínez-Lazcano y colaboradores (2007).

Está ampliamente demostrado que el daño inducido con QUIN en el cuerpo estriado se asocia con el incremento en la expresión y actividad de las NOS (Santamaría & Ríos, 1991, 1993) y que la inhibición de las mismas es capaz de prevenir la conducta de giro y peroxidación de lípidos inducida por QUIN (Pérez-Severiano *et al.*, 1998., 2002). Lo cual sugiere que el daño neuronal inducido por QUIN está asociado con la síntesis excesiva de NO. Estudios *in vivo* e *in vitro* mostraron que la activación de los receptores NMDA favorece la formación de ROS a partir de la NOX2 a través de la vía de señalización NO-cGMP-PKG, y el inhibidor específico de la nNOS, 7-Nitroindazol (7-Ni) es capaz de prevenir la formación de las ROS (Girouard *et al.*, 2009).

Existen diversos reportes en los que se demuestra que la sobreactivación de los receptores a NMDA participa en eventos de excitotoxicidad mediando muerte celular y neurotoxicidad (Choi, 1988; Fisher, 1991; Dawson *et al.*, 1996; Ayata *et al.*, 1997). De igual manera está reportado que el QUIN, actúa sobre los receptores a NMDA, sobreactivándolos y permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, el cual se une a la calmodulina activando la isoforma neuronal de la NOS. La activación de la nNOS produce un incremento en la síntesis de NO el cual está involucrado en procesos de neurotoxicidad por estrés oxidativo.

En el presente estudio nosotros demostramos que la falta de la nNOS disminuye la conducta de giro y atenúa la disminución de los niveles de GABA, además de prevenir el daño oxidativo determinado como PL y formación de ROS en el cuerpo estriado posterior a la inyección con QUIN. Existen resultados similares demostrados en ratones y cultivos corticales con mutación nula para la nNOS (-/-)

tras la exposición a NMDA (Dawson *et al.*, 1996; Ayata *et al.*, 1997), donde se muestra una protección ante la ausencia de la nNOS. En nuestros resultados observamos que la conservación de los niveles de GABA en los ratones con mutación nNOS (-/-) fue suficiente para prevenir la conducta de giro ipsilateral.



**Figura 9.** Esquema que resume el posible proceso de muerte celular excitotóxica. a) Ratón homocigoto nNOS (+/+). La sobreactivación de los receptores NMDA causa la entrada de calcio al citosol. El  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la actividad de vías de señalización y enzimas con actividad catalítica un proceso tardío que contribuye a la muerte celular. La activación de la nNOS y producción de radicales libres es un proceso temprano que contribuye a la neurodegeneración potencializando el daño a componentes celulares y disminuyendo las defensas antioxidantes. b) Ratón con mutación nula nNOS (-/-). La deficiencia de la nNOS evita la producción de radicales libres, disminución de las defensas antioxidantes y por tanto el daño excesivo a componentes celulares. La activación de vías de señalización y enzimas con actividad catalítica permanecen activas dando lugar a una muerte neuronal tardía.

El hecho que la mutación nula de la nNOS no prevenga la disminución de los niveles de GABA, pero atenúe dicha reducción y prevenga el daño oxidativo inducido por QUIN, sugiere que el daño oxidativo causado por la producción excesiva del NO generado por la nNOS es un evento temprano en la degeneración, el cual contribuye exacerbando la muerte neuronal. Sin embargo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la activación de los receptores a NMDA, desencadena una serie de eventos como la activación de vías de señalización y proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , contribuyendo a la muerte neuronal tardía (ver figura 9).

La inyección intraestriatal con QUIN demostró la activación de caspasa 3 a partir de las 12 horas de administración provocando una muerte apoptótica (Qin *et al.*, 2000). Por otra parte ratas lesionadas intraestriatalmente con QUIN mostraron incrementos en la expresión de ARNm de la iNOS a partir de las 12 horas después de la lesión con un máximo a las 24 horas (Aguilera *et al.*, 2007), en nuestros resultados no reportamos la presencia de la iNOS ya que no fue posible detectarla mediante inmunoblot a las 2 horas posterior a la lesión. En el mismo sentido en el modelo con ácido kaínico ratones inyectados intraestriatalmente mostraron el incremento en los niveles del ARNm de la iNOS hasta 1 día después de la lesión (Parathath *et al.*, 2007), reflejando el tiempo necesario para que una cantidad considerable de glía sea activada. Es así que el NO producido por la iNOS podría

ser el responsable de la degeneración tardía observada en los ratones deficientes de la nNOS.

De acuerdo con reportes anteriores (Huang *et al.*, 1993; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007), no detectamos la presencia de la nNOS por inmunoblot en el cuerpo estriado de los ratones con mutación nula nNOS (-/-). Por otra parte se detectó la expresión de la eNOS en los 3 distintos genotipos, consistente con los reportes anteriores indicando que la expresión de la eNOS es similar en los 3 genotipos (Huang *et al.*, 1993; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007).

Después de la inyección con QUIN existe un incremento en la actividad como de la cNOS principalmente (Schmidt *et al.*, 1995; Pérez-Severiano *et al.*, 1998). En nuestros resultados se muestra que los ratones con mutación nula para la nNOS (-/-) mostraron una disminución en la actividad de la NOS total en comparación con sus hermanos homocigotos (+/+) y heterocigotos (+/-), pero mostraron niveles similares en la actividad independiente de  $Ca^{2+}$ . Esta diferencia en la actividad total de la NOS, se debe a la disminución significativa de la actividad de la NOS constitutiva dependiente de  $Ca^{2+}$ .

En nuestros resultados se observa que los ratones de los 3 distintos genotipos lesionados intraestriatalmente con QUIN muestran un aumento de la expresión del gen *htt*. Resultados similares a los encontrados por Carlock y Tatter que mostraron un aumento en la expresión tanto del ARN mensajero como de la proteína htt en respuesta a la sobreestimulación de los receptores NMDA con QUIN (Carlock *et al.*, 1995; Tatter *et al.*, 1995). Siendo así que el incremento de la htt en respuesta al evento excitotóxico complementaría la hipótesis del grupo de Schwarcz (2009) y proveer una explicación parcial para la degeneración específica observada en la EH (ver figura 2). Acorde con los resultados demostrados por Guidetti y colaboradores (2006), en modelos transgénicos de la EH donde se encontró un incremento significativo de 3-HK y QUIN en la corteza y el estriado, regiones cerebrales que son particularmente vulnerables. Indicando que el incremento en la longitud del tracto de poliglutamina de la htt es requerido para promover niveles elevados de QUIN. Además, el hecho que niveles fisiológicos de QUIN puedan

causar daño excitotóxico, implica a este metabolito endógeno como posible causante de la neuropatología de la EH (Guidetti *et al.*, 2006). Respecto a la relación que guardan la htt con la nNOS Li y colaboradores (1996), demostraron una relación entre nNOS y la HAP1, una proteína de asociación con la htt que posee mayor afinidad a la mhtt, resultando en una interacción aberrante, la cual podría causar el incremento en la producción del NO contribuyendo al daño neuronal.

Finalmente, concluimos que en los ratones deficientes de la nNOS existe una disminución de la neurotoxicidad inducida por QUIN. Demostrando así que el NO participa en el daño neuronal temprano por estrés oxidativo en un modelo de excitotoxicidad.

## REFERENCIAS

Alderton WK, CE Cooper & RG Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.* **357**: 593-615.

Aguilera P, ME Cádiz-Cádenas, E Floriano-Sánchez, D Barrera, A Santamaría, DJ Sánchez-González, F Pérez-Severiano, J Pedraza-Cheverri & PD Maldonado. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthase in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology.* **28**: 1200-1207

Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ et al. 1997. Mechanisms of Reduced Striatal NMDA Excitotoxicity in Type I Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience.* **17**(18):6908-6917

Bates G, P Harper & L Jones. 2002. Huntington's Disease. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford Monographs on Medical Genetics.

Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW & RH Brown. 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **42**(4):644-654.

Bredt, D.S., Snyder, S.H., Pou, S., Pou, W.S., and Rosen, G.M. 1992. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol. Chem.* **267**: 24173-24176.

Brown GC. 2010. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide.* **23**:153-65

Bronwen M et al. 2008. Therapeutic perspectives for the treatment of Huntington's disease: Treating the whole body. *Histol Histopathol.* **23**: 237-250.

Calabrese V, C Mancuso, M Calvani, E Rizzarelli, DA Butterfield & AM Giuffrida. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Rev.* **8**:766-775

Carlock L, PD Walker, Y Shan & K Guttridge. 1995. Transcription of the Huntington disease gene during the quinolinic acid excitotoxic cascade. *NeuroReport*. **6**:1121-1124.

Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. **1**:623-34.

Dawson VL, VM Kizushi, PL Huang, SH Snyder & TM Dawson. 1996. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *The Journal of Neuroscience*. **16**(8):2479-87

Deckel AW. 2001. Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. *J Neurosci Res*. **64**(2):99-107.

Drouet V, V Perrin, R Hassig, N Dufour, G Auregan, S Alves, G Bonvento, E Brouillet, R Luthi-Carter, P Hantraye & N Déglon. 2009. Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *American neurological association*. **65**: 276-285.

Endres M, G Scott, S Namura, AL Salzman, PL Huang, MA Moskowitz, C Szabó. 1998. Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose) synthetase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion, *Neurosci Lett*. **248**: 41–44.

Estrada AM, J Mejía-Toiber & L Massieu. 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of huntington's. *Archives of Medical Research*. **39**:265-76

Fisher, R. S. 1991. Introduction to the excitatory amino acid system. *Epilepsy*. **10**:3-8.

Gao X, Kemper A, Popko B. 1999. Advanced transgenic and gene-targeting approaches. *Neurochem Res*. **24**(9):1181-1188

Guidetti P, GP Bates, RK Graham, MR Hayden, BR Leavitt, ME MacDonald, EJ

Slow, VC Wheeler, B Woodman & R Schwarcz. 2006. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiology of disease*. **23**: 190-97

Girouard H, G Wang, EF Gallo, J Anrather, P Zhou, VM Pickel & C Iadecola. 2009. NMDA Receptor Activation Increases Free Radical Production through Nitric Oxide and NOX2. *Journal of Neuroscience*. **29**:2545-2552

Hansson O *et al.* 1999. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Neurobiology*. **96**: 8727-8732.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. 1993. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*. **75**(7):1273-1286.

Huan PL. 1999. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Brazilian Journal of medical and biological research*. **32**: 1353-1359

Huang Z, PL Huang, N Panahian, T Dalkara, MC Fishman & MA Moskowitz. 1994. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*. **265**: 1883-1885

Imarisio S, J Carmichael, V Korolchuk, C Chen, S Saiki, C Rose, G Krishna, JE Davies, E Tofsi, BR Underwood & DC Rubinsztein. 2008. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochemical Journal*. **412**: 191-209.

Jekabsone A, JJ Neher, V Norutaite & GC Brown. 2007. Nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase sensitises neurons to hypoxia-induced death via competitive inhibition of cytochrome oxidase. *J Neurochem*. 103(1):346-56

Knowles RG & S Moncada. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem.* **298**: 249-258.

Leipnitz, G., Schumacher, C., Scussiato, K., Dalcin, K. B., Wannmacher, C. M., Wyse, A. T., Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., and Latini, A. 2005 Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 23(8), 695-701.

Li XJ, AH Sharp, SH Li, TM Dawson, SH Snyder & CA Ross. 1996. Huntingtin-associated protein (HAP1): Discrete neuronal localizations in the brain resemble those of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl acad Sci.* **93**: 4839-4844.

Lipton SA, DJ Singel & JS Stamler. 1994. Nitric oxide in the central nervous system. *Prog Brain Res.* **103**: 359-364.

Martínez-Lazcano JC *et al.* 2007. Selective Protection Against Oxidative Damage in Brain of Mice With a Targeted Disruption of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene. *Journal of Neuroscience Research.* **85**: 1391-1402.

Mayer B, Koesling D. 2001. cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci.* 22(11):546-548.

Moncada S & EA Higgs. 2006. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exsp Pharmacol.* **176**:213-54

Mukhopadhyay P, M Rajesh, S Bátkai, Y Kashiwaya, G Haskó, L Liaudet, C Szabó & P Pacher. 2009. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol heart Circ Physiol.* **296**: 1466-1483.

Nansheng C, T Luo, C Wellington, M Metzler, K McCutcheon, MR Hayden & LA Raymond. 1999. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *Journal of neurochemistry.* **72**:1890-1898.

Leavitt BR, JM van Raamsdonk, J Shehadeh, H Fernandes, Z Murphy, RK Graham, CL Wellington, LA Raouf & MR Hayden. 2006. Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem.* **96**:1121-29.

Luo ZD, Cizkova D. 2000. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain.* 4(6):459-466.

Pacher P, JS Beckman & L Liaudet. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* **87**: 315-424.

Parathath SR, I Gravanis, SE Tsirka. 2007. Nitric oxide synthase isoforms undertake unique roles during excitotoxicity, *Stroke.* **38**: 1938–1945.

Pérez-Neri I., Castro E., Montes S., Boll M. C., Barges-Coll J., Soto-Hernández J. L., Ríos C. 2007. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **51**:250-256.

Pérez-Severiano F, B Escalante & C Ríos. 1998. Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Acute Quinolate-Induced Striatal Neurotoxicity. *Neurochemical Research.* **23**: 1297-1302.

Pérez-Severiano F, C Ríos & J Segovia. 2000. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain research.* **862**: 234-237

Pérez-Severiano F, B Escalante, P Vergara, C Ríos & J Segovia. 2002. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Research.* **951**: 36-42.

Pérez-Severiano F, S Montes-López, C Gerónimo-Olvera & J Segovia. (enviado) Study of oxidative damage and antioxidant system in two Huntington's disease models.

Petersén A, O Hansson, Z Puschban, E Sapp, N Romero, RF Castilho, D Sulzer, M Rice, M DiFiglia, S Przedborki & Patrik Brundin. 2001. Mice transgenic for exon 1 of the Huntington's disease gene display reduced striatal sensitivity to neurotoxicity induced by dopamine and 6-hydroxydopamine. *European Journal of Neuroscience*. 14: 1425-1435.

Qin ZH, Y Wang & YH Chusea. 2000. A caspase-3-like protease is involved in NF- $\kappa$ B activation induced by stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum. *Molecular Brain Research*. **80**: 111-122.

Ríos C. & A Santamaria. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochemical Research*. **16**:1139-1143

Santamaría A & Ríos C. 1993. MK-801, and N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett*. **159**:51-4

Schulz JB, PL Huang, RT Matthews, D Passov, MC Fishman & MF Beal. 1996. Striatal Malonate Lesions Are Attenuated in Neuronal Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. *J Neurochem*. **67**: 430-433.

Schwarcz R, P Guidetti, KV Sathyaikumar & PJ Muchowski. 2010. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, **90**(2):230-45

Stack EC, WR Matson & RJ Ferrante. 2008. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1147**: 79-92

Tatter SB, WR Galpern, AT Hoogeveen & O Isacson. 1995. Effects of striatal excitotoxicity on Huntingtin-like immunoreactivity. *Neuroreport*. **6**: 1125-1129.

Triggs WJ. & LJ Willmore. 1984. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. *J Neurochem.* 976-980.

Ungerstedt U. 1971. Striatal dopamine release after amphetamine or nevir degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **367**: 49-68.