



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de la toxicidad de la co-administración subtóxica
de 3-NP y QUIN en estriado de rata**

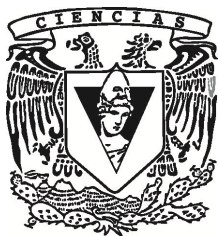
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Alim Caelli Fuentes Bello



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Abel Santamaría Del Ángel
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.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mis padres que a lo largo de toda mi vida y trayectoria escolar han apoyado, han estado a mi lado dando lecciones de vida, consejos, llamadas de atención, gratificaciones, valores y sobretodo mucho amor; ellos han sido mi fuente de inspiración y respeto, el ímpetu con el cada mañana me levanto para llegar a enorgullecerlos, el producto de años de esfuerzo y dedicación convertidos en una mujer que llega a su primera gran meta. A mi hermana que me ha aconsejado, ha sido mi cómplice en innumerables situaciones, me ha apoyado y a la vez orientado cuando intento trazar un camino erróneo, una hermana y amiga que de varias formas ha influido en mi desarrollo tanto personal como profesional y que en gran parte debo este triunfo .

Así también agradezco a Abel, Paul y Vero que me han acompañado a lo largo de este proyecto de investigación, han compartido sus conocimientos, han tenido paciencia y entusiasmo con los obstáculos que se nos presentaron, también doy gratitud a su amistad y disponibilidad.

Agradezco a Diana, que colaboró conmigo en este proyecto, que es una sobreviviente del extenso trabajo que se realizó, sin embargo, agradezco más su invaluable amistad, su entusiasmo, positivismo, lucha, creatividad, cariño, locura y ocurrencias que me han acompañado desde el inicio de esta travesía, sin duda es una gran mujer, estudiante, una excelente e incomparable amiga.

INDICE

<i>Tema</i>	<i>Página</i>
1. Antecedentes (QUIN y 3NP como modelos en la enfermedad de Huntington).....	6
1.1 Glutamato y excitotoxicidad.....	8
1.2 Metabolismo energético y neuronal.....	10
1.3 Ácido 3 nitropropiónico: Micotoxina e inhibidor energético.....	10
1.4 Ácido quinolínico: Efectos neurotóxicos, moleculares, histológicos y conductuales.....	14
1.5 Co-administración sub-tóxica de QUIN + 3NP.....	24
1.6 Peroxidación lipídica.....	25
1.7 Funcionalidad mitocondrial.....	26
2 Objetivos.....	30
2.1 General	
2.2 Particulares	
3 Justificación.....	32
4 Hipótesis.....	33
5 Métodos.....	34
5.1 Peroxidación lipídica.....	35
5.2 Funcionalidad mitocondrial.....	36
5.3 Morfología.....	36
5.4 HPLC	37
6 Resultados.....	39
6.1 Efecto de los modelos QUIN, 3-NP y sinérgico sobre la peroxidación lipídica.....	39

6.2 Efecto de los modelos QUIN, 3-NP y de facilitación sobre la disfunción mitocondrial.....	41
6.3	
Morfología.....	43
6.4 Alteraciones en los niveles de GABA en los modelos con QUIN, 3-NP y de facilitación.....	46
7. Discusión.....	48
8. Conclusión.....	53
9. Bibliografía.....	54

RESUMEN

Introducción. La excitotoxicidad y las alteraciones del metabolismo energético, son dos de los principales eventos patológicos implicados en el daño neuronal que se presenta en diversos desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington. A nivel celular ambos eventos patológicos están estrechamente relacionados. Por un lado la excitotoxicidad que sobre-activa los receptores NMDA puede producir daño mitocondrial mediado por calcio, la activación de proteasas dependientes de calcio, así como por la generación de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, la disfunción energética puede conducir al agotamiento del ATP alterando el funcionamiento de las bombas iónicas membranales ATP-dependientes resultando en despolarización de la membrana y generando "excitotoxicidad secundaria. Se ha demostrado con anterioridad que la administración conjunta de dos toxinas con mecanismos de acción diferentes puede producir toxicidad sinérgica. **Objetivo:** En el presente trabajo se pretende conocer los efectos de la administración subtoxic *in vivo* de dos toxinas distintas (3-NP y QUIN), sobre los niveles de peroxidación lipídica, la viabilidad mitocondrial, los niveles totales de GABA y la morfología celular del cuerpo estriado en ratas. **Metodología:** Se utilizaron 24 ratas Wistar macho de entre 280-300 gramos y se formaron 4 grupos (n=6): 1) control, 2), QUIN i.e. bilateral subtóxico (20nmol/ μ l por lado) 3) 3NP i.p. subtóxico (9mg/kg), 4) 3NP i.p. (9mg/kg) y QUIN i.e (20nmol/ μ l por lado) bilateral subtóxicos. Se empleó el método de reducción de sustancias reactivas al TBA para cuantificar la peroxidación lipídica (PL) y el de reducción de sales de MTT para medir la funcionalidad mitocondrial en fracciones sinaptosomales; para la cuantificación de células alteradas se realizaron cortes coronales a los cerebros previamente perfundidos y se realizó una tinción con hematoxilina-eosina; en cuanto a la concentraciones de GABA, fueron cuantificadas por medio de cromatografía líquida de alta resolución usando una derivatización de precolumna o-phtalaldehído/t-butitioil (OPA). **Resultados:** en el grupo de co-administración subtóxica se observó un incremento significativo en los niveles de PL en sinaptosomas estriatales del 50% con respecto al control ($P<0.05$), también se observó un mayor número de células dañadas en este mismo grupo del 300% respecto al control ($P<0.05$); en la funcionalidad mitocondrial existió una tendencia a la disminución en el grupo co-administrado, pero ésta no fue significativa y finalmente los niveles de GABA en el estriado no se observaron alterados. **Conclusión:** El modelo de facilitación tóxica muestra que la administración de sub-tóxica de 3NP y QUIN incrementa la peroxidación de lípidos membranales, altera la morfología neuronal y disminuye la funcionalidad mitocondrial, sin embargo los niveles de GABA no se muestran alterados a 30 días de su administración.

1. Antecedentes

QUIN y 3NP en la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo producido por la expansión del trinucleótido CAG en el gen huntingtina (htt). La EH está caracterizada por demencia y degeneración de los ganglios basales (caudado-putamen) y la corteza cerebral, y clínicamente se presenta con movimientos anormales de tipo coreico. La EH afecta humanos de mediana edad (35-50 años) y presenta un patrón de herencia autosómico dominante. La mutación está localizada en el brazo corto del cromosoma 4, siendo la htt su proteína mutada (The Huntington's Disease Collaborative Research Group (H.D.C.R.G), 1993). La htt de tipo silvestre presenta más de 35 residuos de glutamina, mientras que su forma mutante muestra 38 o más residuos. Por lo tanto, es considerada como un parámetro diagnóstico que los pacientes con la EH presenten más de 35 repeticiones de CAG en exón 1 de la htt, sin embargo una variante juvenil de la enfermedad con un inicio temprano puede mostrar más de 250 repeticiones de CAG (H.D.C.R.G 1993; Duyao *et al.*, 1993). Hasta ahora la participación precisa de la htt aún se desconoce, sin embargo la proteína mutante puede ser responsable de alteraciones en algunos componentes del citoesqueleto, por consiguiente conduciendo a una afectación del transporte axonal y muerte celular (Duyao *et al.*, 1993).

Las alteraciones bioquímicas encontradas en la región del caudado de pacientes con la EH son una consecuencia de muerte celular selectiva en neuronas de los ganglios basales. Estos cambios incluyen disminución en los niveles de ácido γ -aminobutírico (GABA) y la síntesis de su enzima glutamato descarboxilasa (GAD), acetilcolina (Ach) y la síntesis de su enzima acetil-colina transferasa (CAT), y algunos péptidos específicamente localizados en neuronas espinosas de talla media (Shoulson, 1984). Adicionalmente, alteraciones importantes en el número de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) han sido descritos, sugiriendo que

algunos componentes de la transmisión glutamatérgica pueden estar involucrados como factores causa en la EH (Ellerby, 2002).

En la EH, se pueden distinguir tres estadios de acuerdo a la severidad y progresión de la enfermedad: temprana, media y tardía. En el nivel de comportamiento, la EH está caracterizada por irritabilidad, obsesiones y compulsiones, alucinaciones, deterioro de la memoria, alteración de la dinámica familiar, disminución de las funciones ejecutivas y demencia, todos ellos inexorablemente progresando a lo largo de las diferentes etapas. El déficit cognitivo está acompañado de alteraciones motoras, las cuales incluyen alteraciones en movimientos involuntarios y voluntarios. La inquietud motora, distonía y corea son movimientos característicos involuntarios de pacientes con la EH, mientras que los movimientos voluntarios pueden estar afectados por bradicinesia, falta de coordinación y retraso en la iniciación de los movimientos, así como en el deterioro en su modulación (The Huntington's Disease Society of America, 2006).

Mientras que los cambios neuroquímicos pueden ser responsables de algunas de estas alteraciones motoras, aún no es claro si el patrón complejo y progresivo del déficit motor y cognitivo es el resultado de múltiples sistemas de neurotransmisores comprometidos o poblaciones neuronales afectadas. En este aspecto se asume que el componente glutamatérgico en la EH puede estar relacionada a estados de excitación temprana, por lo cual, estos cambios pueden ser dependientes del agotamiento de GABA (The Huntington's Disease Society of America, 2006). Los sistemas afectados dopaminérgicos y colinérgicos, también han sido involucrados en la EH y constituye una fuente de investigación continua.

El uso de modelos animales de la EH tiene el propósito de tratar de elucidar aquellos mecanismos tóxicos que conducen a daño neuronal y sus posibles interacciones y se pueden clasificar dentro de tres categorías: 1) modelos excitotóxicos, 2) modelos de deterioro del metabolismo energético y 3) modelos transgénicos. Por lo tanto, dada la información que ha sido recogida a través de varios años de investigación sobre estos paradigmas y los desórdenes humanos, se puede sugerir sin excluir la mayor hipótesis para neurotoxicidad observada en

la EH: a) excitotoxicidad a través de la sobre-activación de los receptores NMDA acompañada de estrés oxidativo y eventos inflamatorios; b) deterioro del metabolismo energético conduciendo a daño metabólico, daño oxidativo y excitotoxicidad secundaria, y c) delección de la proteína huntingtina, conduciendo a su agregación, comprometiendo componentes estructurales de células nerviosas y futuro daño metabólico.

En otro de los patrones patológicos de esta enfermedad se observa la disminución de los niveles de glucosa y oxígeno en los ganglios basales y en la corteza cerebral (Beal 1992). Los cambios específicos en el metabolismo respiratorio ocurren comúnmente en la actividad de los complejos I y IV (Brennan *et al.* 1985, Borlongan *et al.* 1997), y con menor frecuencia también en la actividad del complejo II.

En consecuencia, las toxinas que afectan la mitocondria están siendo usadas como herramientas farmacológicas para mimetizar muchas enfermedades como la enfermedad de Huntington. Entre ellas, el 3NP, MPTP, rotenona y malonato son bien establecidos como inhibidores del complejo mitocondrial frecuentemente usados para investigar las vías celulares clave que provocan neurodegeneración en Parkinson o Huntington (Browne and Beal, 2002)

Estos hallazgos están de acuerdo con un estudio previo en ratas lesionadas con ácido quinolínico, un metabolito endógeno que se encuentra en la vía de la kinurenina que ha sido extensivamente usado como otro modelo animal de la enfermedad de Huntington (Beal *et al.*, 1986).

1.1 Glutamato y excitotoxicidad.

El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el sistema nervioso. La acción del glutamato en las neuronas esta mediada a través de dos tipos de receptores: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos reciben este nombre debido a que se encuentran unidos a canales iónicos y tienen un papel muy importante en la neurotransmisión glutamatérgica rápida y basal. Los receptores ionotrópicos se clasifican de acuerdo a la especificidad mostrada a

diferentes ligandos en: receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolpropionico (AMPA) y receptores 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina (kainato). 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).

La excitotoxicidad involucra un drástico incremento en las concentraciones de Ca^{2+} en respuesta a una sobreexposición de las neuronas a los efectos de los aminoácidos excitadores (AAE), como el glutamato y sus análogos. En particular, los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) juegan un papel relevante en la neurotoxicidad inducida por AAE desde su ampliamente distribuido complejo canal permeable a Ca^{2+} . Cuando el complejo receptor-canal es estimulado por agonistas endógenos o exógenos, una repentina y drástica entrada de este ión a las neuronas puede conducir a la activación de vías metabólicas tóxicas involucrando enzimas proteolíticas (proteasas y endonucleasas), y por consiguiente incrementando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Rami *et al.* 1997). El incremento en la entrada de Ca^{2+} se acompaña de

una mayor liberación de glutamato lo cual a su vez amplifica el daño celular a través de una retroalimentación positiva, conduciendo así a la muerte apoptótica o necrótica (Siesjo 1981, Choi 1988, Saito *et al.* 1993).

1.2. Metabolismo energético neuronal

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente vulnerable a variaciones en recursos energéticos debido al metabolismo elevado de las neuronas y su constante demanda de substratos. Por tal razón, cualquier alteración en el metabolismo energético representa un riesgo potencial para el daño y muerte neuronal (Lees, 1993). Cambios en la accesibilidad de los substratos energéticos (tales como privación de oxígeno o glucosa) producen una alteración de las bombas iónicas membranales dependientes de ATP lo cual genera un mayor desbalance en la concentración de iones, afectando el potencial de membrana y finalmente conduciendo a su despolarización lo cual favorece la activación de más canales NMDA induciendo mayor entrada de Ca^{2+} a la célula (excitotoxicidad secundaria) (Martin *et al.* 1994).

1.3. Acido 3 nitropropiónico

Durante 1950-1960's, el ácido 3 nitropropiónico (3NP) fue identificado como la causa del envenenamiento de gallinas y mamíferos en el oeste de los E.U.A., causando debilidad general que involucra parálisis. La toxina fue originalmente caracterizada como el agente tóxico responsable de la encefalopatía aguda del ganado vacuno en las regiones del oeste de Norte América. Los animales accidentalmente ingirieron *Astragalus* (indigofera), el cual tiene grandes cantidades de 3-NP. Las investigaciones bioquímicas demostraron después que el 3-NP es un inhibidor irreversible del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la enzima SDH del intercambio respiratorio, el principal constituyente del complejo II de la cadena respiratoria (Alston *et. al.*, 1977; Coles *et. al.*, 1979). Posteriormente, cerca de 1000 casos de envenenamiento de 3-NP fueron reportados en China. El

consumo de caña de azúcar enmohecida contaminada por el hongo *Arthrrium* durante la celebración del año nuevo Chino produjo encefalopatía aguda en niños y adultos, seguido en muchos casos por retraso de distonía y discinesia asociadas con la degeneración del putamen (He et. al., 1995).

La ingesta accidental de la toxina mitocondrial ácido 3 nitropropiónico produce degeneración preferencial del putamen y el núcleo caudado asociado con severos síntomas neurológicos en humanos (Strauss and Morton, 2003). La administración experimental de 3NP en primates no humanos produce efectos similares (Roitberg et al., 2002). En roedores, el caudado-putamen (forman una sola estructura anatómica llamada estriado), es también particularmente vulnerable a la administración sistémica de 3NP, así que el 3NP puede ser usado para replicar en animales de laboratorio el fenotipo de ciertas condiciones asociadas con degeneración del caudado-putamen (Strauss and Morton, 2003).

El 3NP produce cambios neurodegenerativos que son reminiscentes de aquellos reportados en un número de condiciones clínicas causadas por defectos mitocondriales principalmente genéticos, desorden en el metabolismo energético-oxidativo resultado del envenenamiento, isquemia, hipoxia perinatal (Beal, 2005; Janavs y Aminoff, 1998). La administración sistémica de 3NP puede ser considerada como un camino químico-farmacológico en el cual un modelo de desorden mitocondrial y desorden neurodegenerativo involucran el deterioro del metabolismo energético. Sin embargo, reciente investigación en 3NP se ha conducido en el contexto de la enfermedad de Huntington. Esto probablemente resulta del hecho de que el fenotipo neurodegenerativo de la enfermedad de EH (degeneración del caudado-putamen con déficits motores y cognitivos) puede ser, hasta cierto punto, reproducible usando la administración crónica de 3NP. De forma importante, el 3NP produce disfunción mitocondrial, lo cual se sospecha que puede ocurrir muy pronto en el curso de la EH y ha sido observado en modelos transgénicos de este desorden (Koroshetz et al. 1997; Jenkins et al. 1998; Sawa et al. 1999; Panov et al. 2002). En particular, el mecanismo primario subyacente a la toxicidad estriatal del 3NP es la inhibición selectiva de la actividad

del complejo II del transporte de electrones (Succinato deshidrogenasa, SDH) (Gu *et al.* 1996; Browne *et al.* 1997; Tabrizi *et al.* 1999).

Algunos estudios pioneros en animales de laboratorio condujeron a la caracterización anatómo-patológica de la toxicidad de 3NP. A principios de 1980, Gould y colaboradores demostraron que el tratamiento con 3NP produjo degeneración preferencial del estriado en ratas y ratones (Gould and Gustine 1982; Gould *et al.* 1985). Ellos después mostraron que 3NP produjo lesiones a través de “hipoxia histotóxica” sin gran participación de los efectos periféricos del 3NP, así como el incremento en la presión arterial (Hamilton y Gould, 1987a). En 1987, Hamilton y Gould especularon que la excitotoxicidad mediada por el glutamato puede jugar un rol en la degeneración estriatal inducida por 3NP (Hamilton y Gould, 1987b). Desde esta hipótesis fueron sugeridos mecanismos de la toxicidad de 3NP que con frecuencia han sido asociados con excitotoxicidad. Numerosos estudios en cultivos primarios de neuronas mostraron que, en ciertas circunstancias, el bloqueo del metabolismo energético oxidativo podría conducir de forma secundaria a la cascada excitotóxica de muerte celular (en ausencia de un mayor incremento en concentraciones extracelulares de glutamato) y este fenómeno involucra principalmente receptores NMDA (Novelli *et al.*, 1988; Zeevalk y Nicklas 1990, 1992; Greene *et al.*, 1998). Después se encontró que la inyección estriatal de toxinas mitocondriales (tales como amino-oxiacetato, 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), malonato y rotenona) podría producir lesiones excitotóxicas que parecen lesiones producidas por agonistas de receptores NMDA (ej. NMDA y quinolinato) y podrían ser bloqueadas por la administración del antagonista del receptor NMDA MK-801 (Brouillet *et al.* 1999; Greene y Greenamyre 1996).

Las lesiones producidas por la administración sistémica de 3-NP son más o menos específicas del estriado, así como el hipocampo, tálamo y corteza cerebral. Los mecanismos primarios de acción de esta toxina involucran, como ya se mencionó, la inhibición del complejo II, la succinato deshidrogenasa (SDH) en el intercambio de transporte de electrones mitocondrial. La SDH es una enzima muy importante localizada en el dominio interno de la membrana mitocondrial y es responsable de la oxidación de succinato a fumarato. Cuando la enzima es

irreversiblemente bloqueada por 3-NP, disminuyen los niveles de ATP y el proceso de muerte neuronal puede ser observado.

Estudios bioquímicos en tejido cerebral han sugerido alteraciones mitocondriales en la EH. Un defecto consistente en los complejos II-III mitocondriales se ha encontrado en el núcleo caudado de pacientes con la EH (Stahl y Swanson, 1974; Brennan *et al.*, 1985; Butterworth *et al.*, 1985; Munn *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1996; Browne *et al.*, 1997), con una disminución en la oxidación del succinato que van desde el 39%-59% (Gu *et al.*, 1996 y Browne *et al.*, 1997) se ha reportado un 53% y un 29% de disminución en la actividad de los complejos II y III respectivamente. Un 67% de reducción en la oxidación del succinato también se encontró en el putamen (Browne *et al.*, 1997).

El efecto primario de 3NP es un bloqueo parcial del complejo II. Debido a que la neurotoxina es un inhibidor irreversible de la SDH, el nivel de inhibición de la enzima por 3NP podría ser probado usando ensayos bioquímicos o histoquímica semicuantitativa (Henry *et al.*, 2002). El efecto de 3NP en la SDH en relación al inicio de la degeneración estriatal ha sido caracterizada *ex vivo* (Alexi *et al.*, 1998, Brouillet *et al.*, 1998), indicando que la inhibición de la enzima es similar en el estriado y otras regiones cerebrales. Por lo tanto, la degeneración preferencial del estriado inducida por 3NP no está relacionada a una distribución peculiar de la neurotoxina hacia esta estructura cerebral (Alexi *et al.*, 1998; Brouillet *et al.*, 1998, Blum *et al.*, 2002; Bizat *et al.*, 2003b).

Gould y colaboradores demostraron que los tratamientos con 3NP producen, degeneración preferencial del estriado en ratas y ratones (Gould y Gustine, 1982; Gould *et al.*, 1985). En 1987, Hamilton y Gould especularon que la excitotoxicidad mediada por glutamato puede tener un rol en la degeneración estriatal inducida por 3NP (Hamilton y Gould 1987). Desde que se sugirió esta hipótesis, los mecanismos de toxicidad de 3NP con frecuencia han sido asociados con excitotoxicidad. Numerosos estudios en cultivos primarios de neuronas mostraron que, en ciertas circunstancias, el bloqueo del metabolismo energético oxidativo podría conducir secundariamente a la cascada excitotóxica de muerte celular (en ausencia de un mayor incremento de concentraciones extracelulares de

glutamato) y este fenómeno involucra principalmente receptores NMDA (Novelli *et al.* 1988; Zeevalk y Nicklas 1990, 1992; Greene *et al.* 1998)

La administración sistémica de 3NP puede ser considerada como un interesante camino químico-farmacológico en el cual los modelos de desórdenes mitocondriales y desórdenes neurodegenerativos involucran el deterioro del metabolismo energético. Sin embargo, investigación sobre 3NP ha sido conducida en el contexto de la enfermedad de Huntington (EH), una enfermedad neurodegenerativa que afecta preferencialmente el estriado. Esto probablemente resultó del hecho de que el fenotipo neurodegenerativo de la EH (por ejemplo la degeneración del putamen-caudado con déficit motor y cognitivo) puede ser, hasta cierto punto replicado usando la administración crónica de 3NP y sin embargo, no puede ser considerado como un desorden mitocondrial *bona fide*. Hay evidencia que indica que las anomalías moleculares subyacentes de la EH pueden ser reproducidas por 3NP. Importantemente el 3NP produce disfunción mitocondrial, lo cual se sospecha que ocurre muy pronto en el curso de la enfermedad de Huntington (Brouillet, *et al.* 2005). En particular el mecanismo primario de la toxicidad estriatal de 3NP es la inhibición selectiva de la actividad del complejo II del intercambio respiratorio (succinato deshidrogenasa, SDH), la cual se encuentra reducida en el estriado de pacientes con la EH (Gu *et al.* 1996; Browne *et al.* 1997; Tabrizi *et al.* 1999)

1.4. Ácido quinolínico

El ácido 2,3-piridin bicarboxílico (QUIN) es un metabolito endógeno en la vía de la kinurenina (Figura 1). La vía de la kinurenina (VK) descrita desde 1947 es la mayor ruta catabólica de L-triptofano en mamíferos. La VK es responsable de la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y se ha reportado que está presente en hígado y cerebro de primates no humanos, roedores y otros mamíferos. Un considerable número de importantes funciones fisiológicas se asume que están asociadas a la VK, tales como comportamiento, termorregulación, etc., (Stone, 1993; Guillemin *et al.* 2001).

En el hígado, el anillo indólico de L-triptófano es extirpado oxidativamente por la enzima dioxigenasa del triptófano (DOT) para producir N-formil kinurenina. En el cerebro y otros tejidos periféricos, la enzima responsable de esta reacción es indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), la cual es dependiente de superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Por lo tanto, la IDO requiere sistemas enzimáticos que generan especies oxidativas, tales como ascorbato y xantina-xantina oxidasa, y puede ser inhibida por la superóxido dismutasa (SOD) (Hirata *et al.* 1971) y el óxido nítrico (ON) (Thomas *et al.* 1994). También se ha sugerido que la IDO puede actuar como sistema antioxidante, desde que se usa $O_2^{\bullet-}$ para reducir su forma férrica (inactiva) a su forma ferrosa (activa) *in vitro* (Stone *et al.* 2002). La forma ferrosa de IDO es rápidamente auto-oxidada a la forma férrica en la ausencia de agentes reductores (Taniguchi *et al.* 1979). Tanto dihidroflavin mononucleótido y tetrahydropteridina se han propuesto que actúan como cofactores endógenos para la reducción de IDO (Nishikimi, 1975; Osaki *et al.* 1987; Takikawa, 2005).

El siguiente paso en la VK es la degradación de N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN) por formamidasa. L-KYN sirve como sustrato para diferentes enzimas: kinurenasa (formando ácido antranílico), kinurenina 3-hidroxilasa (formando 3-hidroxikinurenina) y kinurenina aminotransferasas (KAT's), las cuales son responsables de la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA). La formación de KYNA en humanos es muy compleja y usa dos isoformas de KAT's, KAT I y KAT II. Estas enzimas son diferentes unas de otras en un pH óptimo donde KAT II actúa en un rango de pH fisiológico y puede ser responsable de la síntesis de muchas KYNA en cerebro humano (Gramsbergen *et al.* 1997).

Posteriormente, la VK conduce a la formación del ácido quinolínico (QUIN) a través de una serie de pasos, los cuales incluyen la hidroxilación de L-KYN a 3-hidroxikinurenina (3-HK). Esta reacción es catalizada por kinurenina hidroxilasa, una enzima localizada en la membrana externa mitocondrial (Okamoto *et al.* 1967), y requiere una molécula de NADPH como donador de electrones. Entonces la kinurenasa, una enzima piridoxal dependiente de fosfato localizada en el dominio citosólico, convierte 3-HK a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA). Ambas

kinurenasa y kinurenina hidroxilasa están presentes en el sistema nervioso central (SNC), pero exhiben baja actividad. Otra alternativa para formar 3-HA es a través de la hidroxilación de ácido antranílico por enzimas microsomales de hidroxilación.

La 3-hidroxiantranilato dioxigenasa (3-HAO) abre sus anillos de 3-HA para producir 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, un intermediario inestable, el cual es transformado inmediatamente a QUIN. En el cerebro, la 3-HAO muestra una actividad más alta que otras enzimas de la VK (Okuno *et al.* 1987; Okuno y Kido, 1991; Saito *et al.* 1992). La evidencia de inmunohistoquímica ha demostrado que ambas 3-HAO y KAT están localizadas en astrocitos alrededor de la sinapsis glutamatérgica en el sistema nervioso central (Roberts *et al.* 1992; Roberts *et al.* 1995). Finalmente, QUIN es metabolizado dentro del ácido nicotínico dinucleótido (NAD) mediante la quinolinato fosforibosil transferasa (QPRT), una enzima también localizada en astrocitos (Stone, 1993). Interesantemente, se ha mostrado que la QPRT no está localizada específicamente en astrocitos rodeando la sinapsis glutamatérgica. Por otra parte, estudios de inmunohistoquímica revelaron que la relación entre 3-HAO y QPRT es diferencial a lo largo del cerebro, principalmente predominando en la neocorteza, el estriado y el hipocampo (Kohler *et al.* 1987; Kohler *et al.* 1988). El interés en el estudio de la VK ha incrementado recientemente, desde que las alteraciones en esta vía han estado implicadas en muchos desórdenes del SNC, incluyendo la enfermedad de Huntington, Alzheimer, Parkinson, etc. (Stone *et al.* 2002; Stone, 2001).

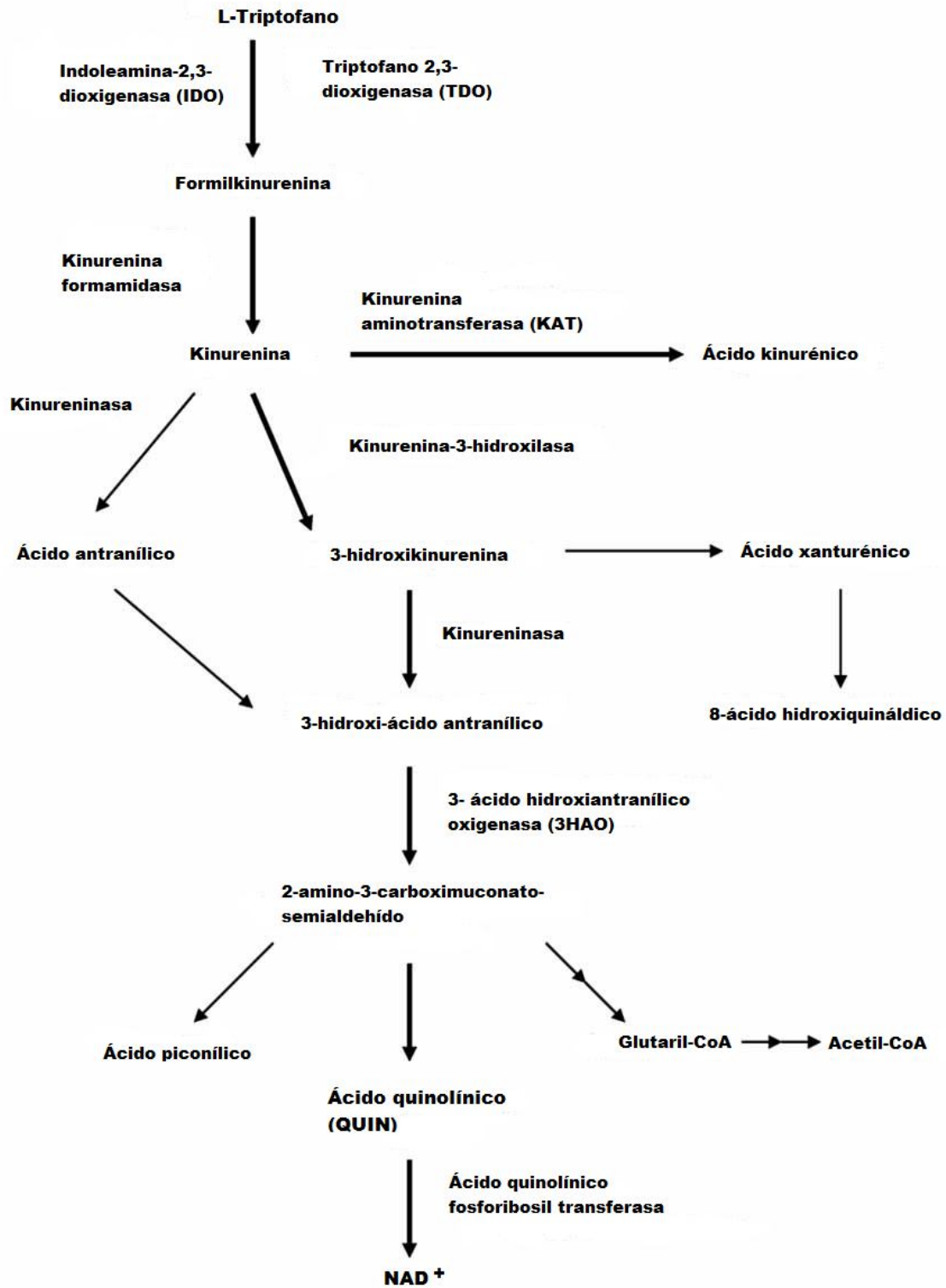


Fig.1. Vía de la Kinurenina (VK) o metabolismo del triptófano

Esta molécula actúa como un agonista del glutamato en los receptores NMDA, y ha sido caracterizada como una excitotoxina poco selectiva que es capaz de dañar el sistema nervioso central (Santamaría *et al.* 2005). La naturaleza endógena de QUIN ha servido para relacionarlo con muchos desórdenes neurológicos involucrando componentes inflamatorios e infecciosos. La sobre-estimulación de los receptores NMDA, por lo cual aumenta la permeabilidad al calcio, disminuye la formación de ATP y produce especies de oxígeno y de nitrógeno (OS/NS) y muerte celular. La excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA (rNMDA), rápidamente daña la mitocondria por la iniciación de acumulación de Ca^{2+} en los organelos (Peng *et al.* 1998; Ward *et al.* 2005), un incremento en la producción de radicales libres (Lafon-Cazal *et al.* 1993; Reynolds y Hastings, 1995), el colapso del potencial de membrana mitocondrial y una disminución en la producción de ATP (Ankarcrona *et al.* 1995; White y Reynolds, 1996). Un deterioro agudo del metabolismo energético oxidativo puede potenciar la excitotoxicidad mediada por rNMDA (Novelli *et al.* 1988; Weller y Paul, 1993; Simpson e Isacson, 1993; Greene y Greenamyre, 1995). La potenciación se asocia comúnmente con una mayor desregulación del Ca^{2+} citosólico. En apoyo a esta hipótesis, las técnicas de imagen de fluorescencia mostraron que, en cultivos de neuronas y rebanadas de cerebro, la activación de rNMDA produce un exacerbado incremento del Ca^{2+} citosólico en neuronas con defectos de intercambio respiratorio (Greene *et al.* 1998; Calabresi *et al.* 2001). Hay tres aspectos fundamentales de los mecanismos de potenciación entre la activación de los rNMDA y los defectos mitocondriales que pueden ser elucidados. Primero, la evidencia para un incremento en las concentraciones del Ca^{2+} citosólico son los acoplamientos perjudiciales de la mitocondria y los rNMDA que nunca se han previsto *in vivo*. Segundo, los mecanismos que conducen a un incremento en el Ca^{2+} citosólico elevado en neuronas con defectos mitocondriales es aún desconocido. Sin embargo, la hipótesis de excitotoxicidad “débil” o “indirecta” es sugerida con frecuencia (Albin y Greenamyre, 1992; Beal, 1992; Greene y Greenamyre, 1995; Beal, 1992b). De acuerdo a esta hipótesis, las alteraciones mitocondriales pueden disminuir la síntesis de ATP, dañar la función de la ATPasa Na/K, de este modo disminuyendo

el potencial de membrana plasmática y aliviando el bloqueo de Mg^{2+} dependiente de voltaje de los rNMDA, induciendo el receptor hipersensitivo a glutamato (Greene y Greenamyre, 1996). Los rNMDA hipersensitivos podrían incrementar la entrada de Ca^{2+} a las neuronas, conduciendo a una desregulación de Ca^{2+} . Sin embargo, es posible que la desregulación del Ca^{2+} citosólico sea una alteración del secuestro y/o extrusión del Ca^{2+} intracelular. Tercero, existe una relación que enlaza la potenciación de excitotoxicidad mediada por los rNMDA y la disfunción mitocondrial parcial crónica que no ha sido caracterizada. Una posibilidad es que la potenciación de la excitotoxicidad es proporcional a la magnitud de los defectos mitocondriales. Alternativamente, las anomalías mitocondriales pueden potenciar la excitotoxicidad mediada por los rNMDA a través de un proceso “todo o nada” (Brouillet *et al.* 1999).

La selectividad en el patrón neurotóxico ejercido por este metabolito es capaz de reproducir muchas características de la EH en roedores y primates no humanos (Beal *et al.* 1986 y Schwarcz *et al.* 1983). Además, la capacidad de QUIN para modificar los perfiles de algunos antioxidantes endógenos, los niveles de glutatión (GSH) y la actividad de la superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD Cu-Zn) en el estriado de rata, así como su capacidad de generar radicales hidroxilo ($\bullet OH$) durante los primeros estados de su toxicidad, y parcialmente de manera independiente de receptores NMDA, han servido para demostrar su naturaleza pro-oxidante. En este aspecto ha demostrado que QUIN puede formar complejos con hierro (Fe^{2+} -QUIN) los cuales son responsables de incrementar la formación de $\bullet OH$ a través de la reacción de Fenton, la cual conduce a daño en ADN y peroxidación de lípidos.

Reacción de Fenton



Además, los ratones transgénicos con expresión limitada de la SOD Cu-Zn, han sido mostrados como más vulnerables a las acciones tóxicas de QUIN, mientras que aquellos animales que sobre-expresan la enzima son más resistente a las acciones nocivas de la toxina (Santamaría *et al.* 2005). Mientras tanto, muchos

agentes actúan como antagonistas glutamatérgicos en receptores NMDA que pueden producir algunos efectos neuroprotectores en el modelos tóxico evocado por QUIN y otros modelos farmacológicos de la EH, una de las más recientes e interesantes tendencias en investigación es la relacionada con el uso de compuestos antioxidantes para el tratamiento experimental de animales lesionados excitotóxicamente, desde que algunos de ellos no son sólo herramientas preventivas importantes contra especies de oxígeno/especies de nitrógeno, sino también neuroprotectores (Santamaría *et.al.* 2005). Aunque el efecto de QUIN en las neuronas ha sido atribuido parcialmente al daño excitotóxico, ha sido demostrado que es responsable de alteraciones progresivas mitocondriales, resultando en la inhibición de complejos II, III y II-III en la cadena de transporte de electrones, con la reducción consecuente de niveles de ATP, que después contribuirían a una neurodegeneración (Bordelon *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2006; Schuck, *et al.*, 2007).

El QUIN es un ácido débil y agonista competitivo del rNMDA el cual contiene NR2A y subunidades NR2B, con baja afinidad receptora (Brown *et al.* 1998). Las concentraciones de QUIN en el tejido del cerebro están en el rango nanomolar (50-100 nM) (Moroni, 1999) o rangos bajos micromolares (0.05-1 μ M) (Schwarcz, 2002), mientras que los ubicados en el suero son un orden de magnitud superiores. Los niveles de QUIN en el cerebro tienen que estar muy elevados para que se puedan ejercer efectos excitatorios en los receptores NMDA. Además de agonista del receptor NMDA, el QUIN también induce peroxidación lipídica y produce ROS (Rodríguez-Martínez *et al.* 2000; Santamaría *et al.* 2001). El óxido nítrico (ON), un radical libre y precursor de especies reactivas potentes como el peroxinitrito (ONOO^-), también puede contribuir a la toxicidad del QUIN, en donde la L-arginina, un conocido precursor del NO aumenta, mientras que la nitroarginina, un selectivo inhibidor selectivo de la síntasa del óxido nítrico (NOS), antagoniza la peroxidación lipídica inducida por el QUIN en rebanadas estriatales de rata (Santamaría *et al.* 1999). La liberación incrementada de glutamato sinaptosomal como consecuencia de la inhibición en la aceptación de glutamato en los astrocitos por QUIN, puede ser también un factor de neurotoxicidad, por el

incremento de concentraciones de glutamato extracelular, lo cual llevará a la sobre-estimulación de estos receptores (Tavares *et al.* 2002).

En ciertas condiciones patológicas, en las cuales la activación microglial ocurre al mismo tiempo, niveles elevados de QUIN fueron medidos en el cerebro o en los fluidos cerebro-espinales (CSF) con el resultado de que la acumulación de este compuesto fue implicada en la etiología o patología de un amplio espectro de enfermedades neurológicas humanas, y particularmente esas con reacciones inflamatorias (Stone, 2001).

A pesar del hecho de que el QUIN es un receptor agonista selectivo de NMDA, sus efectos neurotóxicos también difieren sustantivamente de los del NMDA. En consecuencia, a diferencia del QUIN, el NMDA es una potente neurotoxina en el cerebelo (Garthwaite *et al.*, 1986), no distingue entre poblaciones neuronales en el hipocampo (Nadler *et al.*, 1981), es más efectiva en un cerebro inmaduro que en un cerebro adulto (McDonald *et al.*, 1988) y produce pérdida de células nerviosas que son significativamente menos susceptibles al bloqueo por la KYNA que por lesiones inducidas por el QUIN (Foster *et al.*, 1984). Las razones para éstas remarcables diferencias cualitativas entre ambas excitotoxinas, las cuales supuestamente son muy similares, han sido relacionadas tentativamente al hecho de que el QUIN activa preferentemente solo un subgrupo de receptores de NMDA en el prosencéfalo (De Carvalho *et al.*, 1996; Monaghan and Beaton, 1991), mientras que el NMDA por sí mismo se enfoca en todos los subtipos de receptores. Esta interpretación sería consistente con la observación de que las lesiones causadas por el QUIN son siempre evitables por un amplio espectro de antagonistas del receptor NMDA como el AP5 y el AP7. También sería compatible con un papel de un subconjunto de receptores de NMDA en la fisiopatología de la HD (Fan y Raymond, 2007).

Un estudio de Rios y Santamaría reveló que las características neurotóxicas del QUIN pueden estar relacionadas con su habilidad para estimular peroxidación lipídica bajo condiciones fisiológicas (Rios y Santamaría, 1991). Aún cuando este efecto fue observado en células libres homogenizadas del cerebro, este fue bloqueado por la KYNA o antagonistas específicos de receptores de NMDA como

el MK-801 (Santamaría y Ríos, 1993) y por lo tanto parece ser dependiente de la activación del receptor. La inducción de la peroxidación lipídica, monitoreada por medio de medidas que se toman de la producción de peroxinitrito (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2005), es dependiente del hierro (II) (Stípek *et al.*, 1997) y probablemente está relacionada con la formación de complejos específicos de hierro-QUIN. Sobre la auto oxidación, estos complejos generan radicales reactivos de hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Pláteník *et al.*, 2001; Santamaría *et al.*, 2001). Este mecanismo puede explicar la remarcable potencia neurotóxica del débil agonista para el receptor de NMDA *in vivo*, el QUIN. En apoyo para esta idea, lesiones estriatales inducidas por el QUIN son atenuadas significativamente por el tratamiento con agentes que mejoran la descomposición del peroxinitrito, enlazando hierro ferroso y/o recogiendo especies reactivas del oxígeno (ROS) (Müller *et al.*, 2007; Nakao *et al.*, 1996; Santiago-López *et al.*, 2004).

Agente excitotóxico

Diferentes compuestos han sido empleados para producir modelos excitotóxicos de la EH, entre ellos están NMDA, ácido kaínico, ácido iboténico y ácido quinolínico (QUIN). Los efectos de algunas de estas toxinas han sido investigadas en el cerebro de rata con el objetivo de comparar la extensión del daño neuronal que esto produjo (Foster *et al.* 1983, Schwarcz *et al.* 1983, Beal *et al.* 1986).

Después de observar las alteraciones morfológicas y perfiles bioquímicos en el estriado de animales lesionados, algunos cambios se parecen a las alteraciones en cerebros de la EH, siendo estos la disminución en los niveles de GABA, Ach y sustancia P. Sin embargo, el QUIN ejerce más efectos selectivos y específicos, los cuales son también similares a aquellos de la EH.

Se compararon los resultados de conducta de experimentos donde se realizaron inyecciones intraestriatales de QUIN vs ácido 3-nitropropiónico (3-NP, una toxina mitocondrial) en ratas, y se encontró que ambas toxinas causaron un incremento en la actividad locomotora dos semanas después de la lesión, pero sólo la hiperactividad inducida por QUIN duró hasta cuatro semanas, y ambas toxinas son

capaces de afectar el aprendizaje. Un estudio en primates no humanos reveló que los animales tratados con QUIN mostraron hiperactividad nocturna, postura anormal, y daño en respuestas sucesivas en una prueba de recuperación de objetos (Roitberg *et al.* 2002). Sin embargo este y otros estudios de conducta sugieren que QUIN también mimetiza estadios tempranos de la EH a nivel conductual. De hecho, el QUIN se ha sido sugerido como un agente potenciador envuelto en la patogénesis de la EH.

Los niveles de este metabolito, junto con otros metabolitos de la kinurenina, responsables de la formación de ERO, como la 3-hidroxicinurenina (3HK), están incrementados en el estriado y corteza de cerebros de la EH (Guidetti *et al.* 2004).

La ruta de la kinurenina es una ruta metabólica típicamente localizada en las células gliales y reduce al triptófano a muchos metabolitos con diferentes funciones redox. El QUIN es un metabolito endógeno en la vía de la kinurenina actuando como un agonista selectivo en los receptores NMDA (Stone 1993), y produce la despolarización de la membrana y el flujo de Ca^{2+} dentro de las células neuronales, resultando en daño cuando se prueba en concentraciones tóxicas. Diferentes alteraciones metabólicas producidas por QUIN incluyen la reducción en el consumo de O_2 mitocondrial, la disminución de los niveles de ATP y NAD^+ , y cambios importantes en las concentraciones de glutamato y aspartato (Bordelon *et al.* 1997). El QUIN también es responsable de otros efectos tóxicos, así como niveles incrementados de Ca^{2+} intracelular, disminución en los niveles de GABA, peroxidación de lípidos y estrés oxidativo y futura muerte celular apoptótica o necrótica (Foster *et al.* 1983, During *et al.* 1989, Santamaría y Rios 1993). La toxina reproduce el patrón de pérdida celular selectiva GABAérgica y colinérgica encontrada en la EH, afectando principalmente las neuronas espinosas estriatales de talla mediana (Bordelon *et al.* 1997, El-Defrawy *et al.* 1986).

Agente pro-oxidante

El QUIN ha sido asociado con la estimulación de procesos tumorales a través de la posible formación de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Harman, 1993). Recientemente

se demostró que la toxina induce directamente la formación de $\bullet\text{OH}$ bajo condiciones *in vivo* en el cuerpo estriado de ratas en un mecanismo que se ha visto, es independiente de receptores NMDA (Santamaría *et al.*, 2001). Otros reportes enfatizan el involucramiento del óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y el anión superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) en el daño neuronal inducido por QUIN, por lo que se demuestra su habilidad potencial para producir peroxinitrito (ONOO^-) altamente tóxico en el curso de días (Noack *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 2004) o incluso horas (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2005). El origen de ONOO^- en este modelo está en una vía dirigida a la expresión y la actividad de la sintasa inducible de NO (iNOS) (Ryu *et al.*, 2004), de este modo incrementando los niveles de $\text{NO}\bullet$, el cual disminuye la actividad de la enzima responsable de la detoxificación de $\text{O}_2\bullet^-$, la superóxido dismutasa (SOD), semejante a un ambiente celular alterado que es propicio para la futura formación de más ERO (especies reactivas de oxígeno) y ERN (Especies reactivas de nitrógeno) (Schmidt *et al.*, 1995).

1.5. Co-administración subtóxica de QUIN + 3NP

El modelo de facilitación por QUIN + 3NP se creó con la infusión intraestriatal bilateral de ácido quinolínico y ácido 3 nitropropiónico de forma intraperitoneal en concentraciones subtóxicas; estas dos toxinas producen lesiones estriatales que son similares a las que se han visto en la enfermedad de Huntington. La inyección de QUIN reproduce la hipersensibilización a glutamato observada en neuronas que sobre-expresan una forma mutada de la huntingtina (htt-m), la proteína implicada en la EH (Laforet *et al.* 2001; Sun *et al.* 2001; Zeron *et al.* 2002). La administración sistémica de 3-NP replica las alteraciones mitocondriales observadas en pacientes con la EH. Se ha reportado que la toxicidad de QUIN es exacerbada por el 3-NP sólo por un rango particular de inhibición del complejo II mitocondrial mayor al 35% e involucra la desregulación de Ca^{2+} , conduciendo a la activación de calpaínas en ausencia de la hipersensibilidad del receptor NMDA (Jacqard *et al.* 2006).

Existe evidencia que la actividad receptora del glutamato y los defectos en la función mitocondrial están envueltos en condiciones neurológicas, así como desordenes cerebrales y enfermedades crónicas neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington. Los defectos mitocondriales y la sobre-activación de receptores del glutamato, incluyendo en particular los subtipos ionotrópicos NMDA, pueden actuar juntos para producir neurodegeneración. Ambas toxinas han sido ampliamente probadas por separado para producir paradigmas tóxicos caracterizados por daño neuronal a los ganglios basales, como ocurre en la enfermedad de Huntington (Shear *et al.* 1998).

1.6. Peroxidación lipídica

La peroxidación de lípidos es una de las mayores consecuencias de lesiones al tejido mediada por radicales libres. La peroxidación de ácidos grasos, sobre todo en fosfolípidos de membrana, tiene tres fases bien descritas: iniciación, propagación y terminación. Hay dos amplias consecuencias de la peroxidación de lípidos: a saber, daño estructural a membranas y generación de productos secundarios. El daño membranal se deriva de la formación de la fragmentación en cadena de ácidos grasos, enlaces cruzados lípido-lípido, y endociclización para producir nuevos ésteres de ácidos grasos y enlaces cruzados lípido-proteína (Farber, 1995). En total, estos procesos se combinan para producir cambios en las propiedades biofísicas de membranas que pueden tener profundos efectos en la actividad de proteínas de membrana. Los productos secundarios de la peroxidación de lípidos pueden ser agrupados conceptualmente dentro de aquellos generados por fragmentación o rearrreglos de lípidos oxigenados; sin embargo, hay que tener en mente que la peroxidación de lípidos es un proceso indiscriminado y la formación de ambos tipos de productos ocurre simultáneamente.

La fragmentación de hidroperóxidos de lípidos libera un número de productos difundibles, algunos de los cuales son potentes electrófilos (Esterbauer, *et al.*, 1991). Los productos difusibles de la peroxidación de lípidos son aldehídos

químicamente reactivos, como el malonldialdehído (MDA), acroleína, 4-hidroxi-2-hexenal (HHE), y 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Schneider *et al.*, 1991; Porter *et al.*, 1995). Los aldehídos reactivos de la peroxidación de lípidos son biológicamente activos. Muchos estudios se han enfocado en su actividad con un número de nucleófilos celulares, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y algunos lípidos (Esterbauer *et al.*, 1991). De hecho, muchos de los efectos citotóxicos de la peroxidación de lípidos pueden ser producidos directamente por productos de la peroxidación lipídica electrofílica, como el HNE (Farber, 1995). Esto incluye pérdida de glutatión, disfunción de proteínas estructurales, reducción en actividad enzimática y la inducción de muerte celular. En trabajos más recientes, muchos modelos realizados *ex vivo* del sistema nervioso central han inducido alteraciones en canales de iones, transportadores y sistemas de actividades de segundos mensajeros, seguido de una exposición a aldehídos reactivos de la peroxidación de lípidos (Mattson, 1998; Keller y Mattson, 1998; Smith *et al.*, 1995).

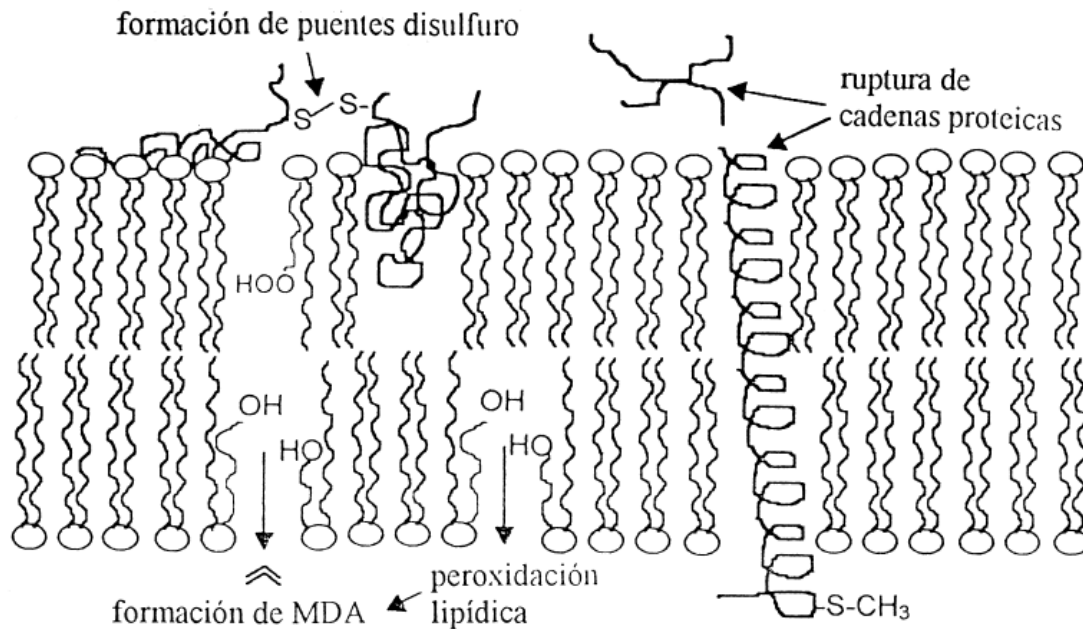


Figura 1. Efectos del daño oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) sobre las membranas.

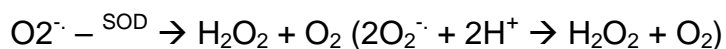
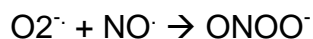
1.7. Funcionalidad mitocondrial

La excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA (r-NMDA) rápidamente daña la mitocondria por la acumulación de Ca^{2+} en los organelos, un incremento en la producción de radicales libres, el colapso del potencial de membrana mitocondrial y una disminución en la producción de ATP. En el evento de una función dañada de uno o más complejos de la cadena respiratoria, la aumentada producción de radicales libres empeora la función mitocondrial, causando daño oxidativo y abriendo los poros de transición mitocondriales de permeabilidad (mtPTPs), de este modo induciendo la apoptosis. El flujo de electrones es acoplado al bombeo de protones en los complejos I, III y IV a través de la membrana interna, resultando en la alteración del potencial de membrana y un declive electroquímico. Como la membrana interna es impermeable a los protones, ellos pueden reentrar a la matriz solo a través de la enzima ATP-asa, induciendo un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima, la cual favorece la fosforilación del ADP y por lo tanto la síntesis del ATP (Heals *et al.*, 1999; Ghafourifar y Cadenas, 2005).

Una pérdida de actividad sustancial de cierto complejo de la cadena respiratoria causa una disminución en la síntesis de ATP. Además, la mitocondria también muestra supresión en la producción de ATP, que se ve influenciada por la demanda metabólica de los tejidos/células (Davey y Canevari, 1997). Si el daño (evocado, por ejemplo, por NOO^{\cdot}) le ocurre a la mitocondria, la célula (astrocito o neurona) fomentará la producción de ATP glucolítico, y esta molécula entrará a la mitocondria para contrarrestar el déficit (Almeida *et al.*, 2001). Hasta la sintasa de F_1F_0 -ATP puede operar en un modo reversible, translocando protones por fuera de la membrana interna a expensas del consumo de ATP, con tal de mantener el potencial de la membrana mitocondrial (Lu *et al.*, 2000).

La cadena respiratoria mitocondrial es una de las fuentes principales de radicales libres dañinos en el organismo humano. Electrones desapareados que escapan de los complejos respiratorios (principalmente de los complejos I y III) pueden llevar a la formación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) por la interacción con el O_2 . Por estímulos fisiológicos o patológicos, la activación de rNMDA conlleva a la acumulación de Ca^{2+} intracelular y a la activación de la sintasa del óxido nítrico

(NOS), generando ON. A su vez, el O_2^- interactúa con el ON para ceder el altamente tóxico anión peroxinitrito ($ONOO^-$) altamente tóxico, o bien generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) espontáneamente o a través de la acción de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD).



Bajo una condición fisiológica, el H_2O_2 se descompone por la glutatión peroxidasa, pero si se forma en exceso, puede reaccionar con iones metálicos de transición (Fe^{2+} o Cu^{2+}) en la reacción Fenton para generar el otro radical tóxico altamente reactivo, el radical hidroxilo ($OH\cdot$).

Estos radicales reactivos destruyen macromoléculas celulares, incluyendo el ADN, lípidos y proteínas. Por ejemplo, la oxidación y nitración de proteínas puede ser de importancia crucial para el ciclo de la célula. Proteínas oxidadas y nitradas preferentemente se someten a una rápida degradación proteolítica (Carreras *et al.*, 2004). Los tipos celulares mayoritariamente involucrados en la producción de ROS en el SNC son la microglia, los neutrófilos y los macrófagos. A pesar de la falta en la mitocondria de histonas protectoras, éstos organelos tienen un mecanismo de reparación de ADN para protegerse contra el daño oxidativo y nitrativo/nitrosativo. Hay dos grupos principales en su sistema de defensa: las enzimas y los antioxidantes de bajo peso molecular (Sies, 1993; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). Sin embargo, estos mecanismos de protección no son particularmente eficientes. Los astrocitos pueden incrementar la glucólisis para mantener su energía de homeostasis, a diferencia de neuronas. Entonces, las células tienen un repertorio adaptativo regenerador contra el estrés oxidativo (Heals *et al.*, 1999; Stewart y Heals, 2003).

Como ya se mencionó, la reacción del ON con el O_2^- genera el altamente tóxico $ONOO^-$, el cual puede causar daño oxidativo y nitrativo a la mitocondria y llevar a vías de muerte celular (Hong *et al.*, 2004). La cadena respiratoria mitocondrial es

particularmente sensible al daño mediado tanto por ON^\cdot como por ONOO^\cdot . El ONOO^\cdot también causa daño al ADN y sobre-activación subsecuente de poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) con la finalidad de reparar la falla genética. Dado que la activación de PARP-1 causada por leves estímulos genotóxicos puede facilitar la reparación del ADN y la sobrevivencia de las células, el daño irreparable del ADN activa la muerte celular apoptótica y necrótica. En la apoptosis, la temprana activación del PARP puede asistir a la cascada apoptótica. Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo más severo, el daño excesivo del ADN causa la sobre-activación del PARP-1, lo cual incapacita la maquinaria apoptótica y cambia el modo de muerte celular de apoptosis a necrosis (Virág, 2005).

La nitración de proteínas puede modificar las funciones de las mismas, y se considera hoy en día que está relacionada con el mecanismo patógeno de muchas enfermedades, por ejemplo la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington. El NO modula el daño celular inducido por neurotoxinas y está involucrado con la muerte de células neuronales en la enfermedad de Parkinson (Zhang *et al.*, 2006). Hay tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) claramente identificadas: las que son producidas principalmente por neuronas (nNOS), las que se producen en células microgliales y macrófagos (iNOS), y las de células endoteliales (eNOS). Sin embargo, ahora se ha identificado con menos claridad y se ha logrado obtener evidencia de que existe un cuarto tipo dependiente de Ca^{2+} ubicado en la membrana interna de la mitocondria (mtNOS), el cual puede ser una variante de la nNOS (Riobo *et al.*, 2002). Los estados redox de la mitocondria son los componentes clave en la regulación de varias funciones celulares básicas, tales como la activación de la cascada de cinasas activada por mitógeno, el transporte de iones, homeostasis del Ca^{2+} y activación del programa de apoptosis. Sin embargo, los potenciales redox son altamente dependientes del ROS (Sas *et al.*, 2007).

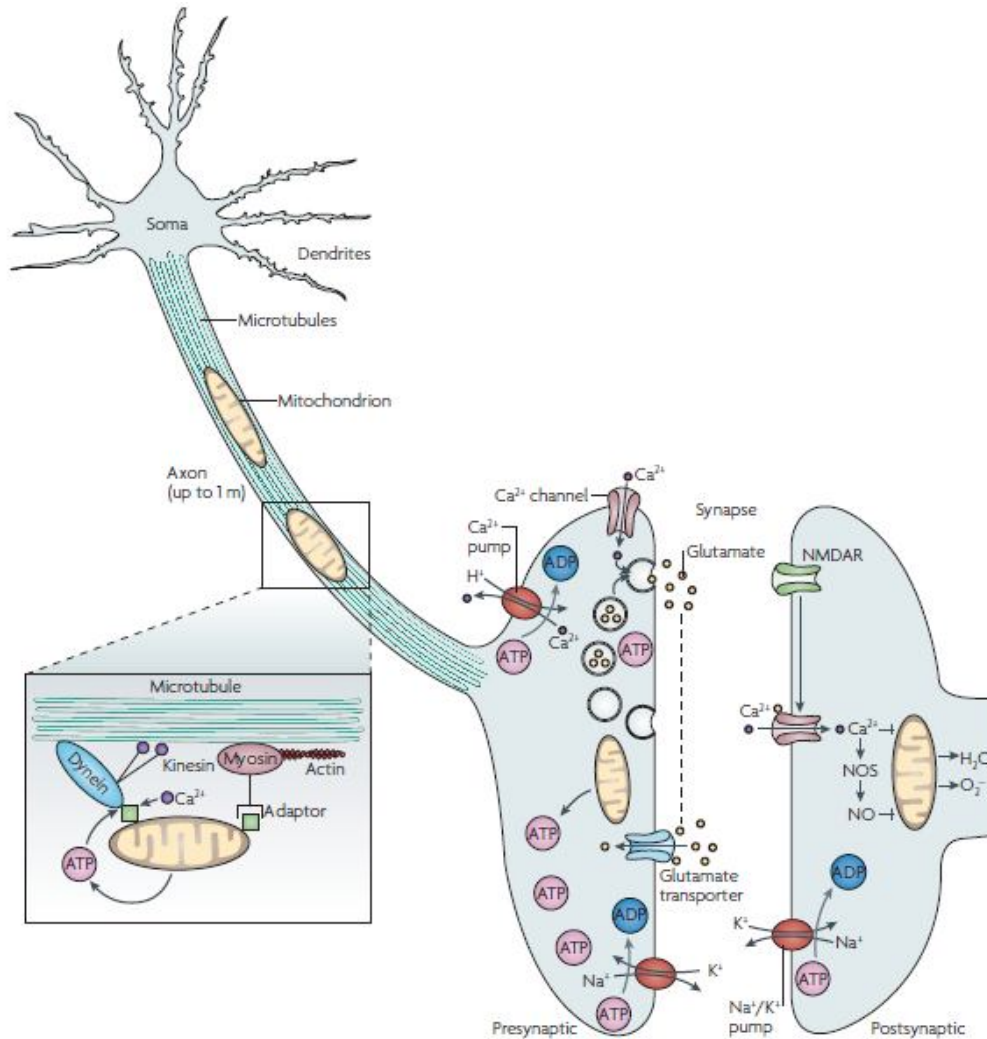


Figura 2. Mitocondria neuronal. Las neuronas contienen varios cientos de mitocondrias que forman estructuras como cables a lo largo de las proyecciones neuronales para ayudar a las neuronas frente a sus demandas de energía. Las neuronas requieren de energía para el transporte de organelos y la carga a lo largo de los microtúbulos o fibras de actina (moléculas tales como dineínas, cinesinas y miosina se utilizan para mediar este proceso) y para mantener los gradientes iónicos y el potencial de membrana con ATP en procesos dependientes de Ca²⁺, bombas de Na⁺/K⁺ y canales iónicos. Además, la carga de vesículas neurotransmisoras en las terminales presinápticas y los neurotransmisores mediados por Ca²⁺ liberados en la hendidura sináptica son también dependientes de ATP. Los transportadores de glutamato median la recaptación de glutamato de la hendidura sináptica y en la membrana postsináptica, y los rNMDA evocan un flujo de Ca²⁺ que a su vez puede activar a la óxido nítrico sintasa (NOS) y estimular la generación de óxido nítrico (ON). Tanto en ON como el Ca²⁺ pueden modular directamente la función mitocondrial, alterando los niveles de especies reactivas de oxígeno (H₂O₂ y O₂) y la producción de ATP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar los mecanismos de toxicidad que se generan por la co-administración sub-tóxica de 3NP y QUIN en estriado de rata.

2.2 Objetivos particulares

- * Evaluar los efectos de la co-administración sub-tóxica de 3NP y QUIN en sinaptosomas de estriado de rata sobre los niveles de peroxidación lipídica.
- * Evaluar los efectos de la co-administración sub-tóxica de 3NP y QUIN en sinaptosomas de estriado de rata sobre la funcionalidad mitocondrial.
- * Evaluar los efectos de la co-administración sub-tóxica de 3NP y QUIN sobre los niveles estriatales totales de GABA.
- * Evaluar los efectos morfológicos de la co-administración sub-tóxica de 3NP y QUIN en estriado.

3. Justificación

La excitotoxicidad y el déficit energético son dos procesos patológicos que se ha demostrado ampliamente que coexisten en diversas enfermedades neurodegenerativas. Se ha descrito previamente un efecto de toxicidad sinérgica con la administración conjunta de dos toxinas con mecanismos de acción diferentes. Sin embargo, hasta el momento poco se sabe acerca de los efectos de la administración sub-tóxica de toxinas con mecanismos de acción diferentes. El estudio de estos efectos tiene gran relevancia como herramienta experimental para conocer los mecanismos patológicos que ocurren en diversas enfermedades neurodegenerativas.

4. HIPÓTESIS

Si dos toxinas con diferentes mecanismos de acción como el 3NP y QUIN se administran de manera conjunta y a concentraciones sub-tóxicas en el estriado de ratas, esto tendrá un efecto facilitador tóxico, lo cual se reflejará en un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, una disminución de la viabilidad mitocondrial, en los niveles de GABA, y finalmente en la alteración morfológica de la misma región cerebral.

5. MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas Wistar machos con un peso de entre 280-300 g, provistas por el bioterio del INNyN (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez). Para cada propósito experimental los animales fueron alojados 5 por cada caja en cajas de acrílico y recibieron una dieta comercial estándar (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc, Richmond , IN USA) y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y luz (ciclos de 12h de luz/12h de oscuridad). Todos los procedimientos con los animales fueron llevados a cabo de acuerdo al *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* y las líneas guía locales del uso ético de animales del Ministerio de Salud de México. Durante los experimentos se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

Grupos experimentales

Para los procedimientos con los diferentes grupos experimentales, los animales fueron seleccionados aleatoriamente y se formaron 4 grupos (seis ratas por grupo), cada grupo correspondiendo a uno de los siguientes tratamientos: 1) recibió solución salina 0.9% intraestriatal $1\mu\text{L}$ y 0.3mL de solución salina i.p.; 2) recibió una dosis de QUIN intraestriatal sub-tóxico ($40\text{ nm}/\mu\text{L}$ en total: $20\text{nm}/\mu\text{L}$ en cada estriado); 3) recibió una dosis de 3-NP intraperitoneal sub-tóxico ($9\text{ mg}/\text{kg}$); 4) recibió QUIN intraestriatal sub-tóxico $40\text{ nm}/\mu\text{L}$ + 3-NP intraperitoneal sub-tóxico $9\text{ mg}/\text{kg}$. Para la administración intraestriatal los animales fueron previamente anestesiados con pentobarbital sódico ($50\text{ mg}/\text{kg}$ i.p) y 20 minutos después se infundió $1\mu\text{L}$ de QUIN ($20\text{ nmol}/\mu\text{L}$ por lado) mediante una inyección bilateral estriatal usando una jeringa Hamilton de $10\mu\text{L}$ en las siguientes coordenadas estereotáxicas: $+0.5\text{ mm}$ anterior a bregma, $\pm 2.6\text{mm}$ lateral a bregma y $- 4.5\text{ mm}$

ventral a la dura madre. Todas las determinaciones siguientes se realizaron 30 días después de la administración tóxica.

En este trabajo el estriado fue elegido como la región cerebral blanco para QUIN y 3NP debido a su gran cantidad de rNMDA, los cuales son particularmente susceptibles a ser sobre-activados, cada uno directa o indirectamente, por ambas toxinas. En adición, se sabe que la actividad redox basal de esta región provee mayores sustratos para reacciones oxidativas y nitrosativas, dirigiéndose a daño celular oxidativo.

Preparación de fracciones sinaptosomales

Treinta días después de la administración de las toxinas se realizó la obtención de las fracciones sinaptosomales del tejido estriatal de todos los animales de todos los grupos (n=6) usando el método descrito con anterioridad (Pérez de la Cruz *et al.* 2008). Los animales fueron sacrificados mediante decapitación se extrajo rápidamente el cerebro y se preservó en hielo por pocos segundos hasta que ambos estriados fueron disecados y homogeneizados en sacarosa (0.32 M). Los homogenados fueron centrifugados a 1073 x g por 10 minutos, y los sobrenadantes después fueron re-centrifugados a 17172 x g por 15 minutos. Los botones resultantes fueron resuspendidos en 40 ml de buffer de HEPES (NaCl 0.1M, NaH₂PO₄ 0.001M, NaHCO₃ 0.005M, CaCl₂ 0.001M, glucosa 0.006M, HEPES 0.01M, pH 7.4). Las fracciones sinaptosomales fueron preservadas a -70°C hasta que el resto de las determinaciones fueron realizadas.

4.1. Peroxidación lipídica

La peroxidación de lípidos fue estimada en fracciones sinaptosomales mediante el método de sustancia reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) como se ha reportado con anterioridad (Pérez de la Cruz *et al.* 2008). El cual brevemente consiste en lo siguiente: se tomaron alícuotas de 250 µl de fracciones sinaptosomales a las cuales se agregaron 500 µl del agente TBA (0.75g de TBA +

15g de ácido tricloroacético + 2.54ml HCl) y las mezclas finales fueron calentadas a 94°C durante 30 min. Después las muestras fueron mantenidas en hielo por 5 min y centrifugadas a 3000 x g por 15 min. La densidad óptica de los sobrenadantes fue medida en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 a una absorbancia de 532 nm. Las concentraciones finales de las sustancias reactivas al TBA (TBARS) fueron calculadas por interpolación en una curva estándar de malondialdehído y corregidas por el contenido de proteína por muestra. Los resultados fueron expresados como nanomoles de TBARS por miligramo de proteína.

4.2. Función mitocondrial

La funcionalidad mitocondrial fue evaluada por el método de reducción de tiazolil bromuro de azul de tetrazolio (MTT), según se ha descrito con anterioridad (Pérez de la Cruz *et al.* 2008). Este método es empleado actualmente como índice parcial del estado funcional del intercambio respiratorio con la formación de sales de formazan que ocurre a través de la acción de las deshidrogenasas mitocondriales en células viables o fracciones celulares. Se tomaron alicuotas con 600 µl de fracciones sinaptosomales ya expuestas a diferentes tratamientos, se les agregaron 8 µl de MTT (5 mg/ml) y fueron incubadas a 37°C por 60 min; después las muestras fueron centrifugadas a 15,300 x g y los pellets fueron resuspendidos en 1 ml de isopropanol por 1 min. Una segunda centrifugación fue hecha a 1,700 x g x 3 min. La cuantificación del formazan fue estimada en los sobrenadantes por densidad óptica en un espectrómetro ThermoSpectronic Genesys 8 a una absorbancia de 570 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de reducción de MTT con respecto a los valores control.

4.3. Histología y análisis morfológico

Treinta días después de la administración de las toxinas los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital i.p. y el cerebro fue

perfundido por vía cardiaca con solución salina al 0.9% pH 7.4 (200ml aproximadamente) y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente se extrajo el cerebro y se realizó post-fijación por 48-72 horas más en una solución de paraformadehído al 4% en solución salina amortiguadora (PBS). Más tarde se realizó el procedimiento de inclusión en bloques de parafina para después obtener cortes coronales de 5 micras de espesor. Todos los cortes coronales fueron obtenidos del estriado dorsal aproximadamente a una distancia de entre 0.5 -1 mm anterior a bregma y fueron teñidos con la técnica convencional de hematoxilina-eosina para observar alteraciones morfológicas en las células estriatales.

Para el análisis morfológico se utilizaron tres cortes de cada estriado, de cada individuo, de cada grupo (n=3). Se contabilizó el número total de neuronas morfológicamente normales y el número total de neuronas degeneradas por campo (40X). Se eligieron como neuronas sanas aquellas cuyo núcleo, nucléolo y citoplasma permanecieron íntegros y bien definidos; se tomaron como células dañadas aquellas cuyo núcleo y nucléolo no eran visualmente distinguibles, o presentaban picnosis, cariólisis o cariorrexis, además de presentar un citoplasma destruido o vacuolizado.

4.4. Cuantificación de GABA

Las concentraciones de GABA en el estriado fueron cuantificadas con cromatografía líquida de alta resolución usando una derivatización de precolumna o-phtalaldehído/t-butitíol (OPA). La derivatización del agente OPA fue preparado como sigue: 25 mg de OPA fueron disueltos en 625 µl de MeOH, 5.6 ml de buffer de boratos 0.3 M pH 9.5, seguido de la adición de 25 µl de 2-mercaptoetanol. El GABA derivatizado fue separado en una columna de fase reversa BAS phase II (100 x 3.2 mm, C18 ODS 3 µ) y detectado usando un detector electroquímico (BAS LC-4B) con un electrodo de carbón vidrioso +0.7 V (vs.Ag/AgCl). La fase móvil consistió de acetato de sodio 0.1 M pH 5.0, EDTA sódico 1 mM en acetonitrilo (60:40 vol/vol) e infundido a través de la columna en 0.8 ml/min. Se

utilizaron curvas estándar con concentraciones en rango de 0.05 pmol a 5 pmol para la cuantificación de GABA.

Los niveles estriatales de GABA fueron medidos en muestras de tejido por el método de derivatización de HPLC con detección fluorométrica. Treinta días después de la administración de las toxinas las ratas de cada grupo (n=3) fueron administradas con ácido mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg, i.v.) y decapitadas 2 minutos después. Las muestras de tejido estriatal fueron disecadas, homogeneizadas en 15 volúmenes de agua-etanol (85 % v/v) y centrifugadas a 3000 x g por 15 min. Los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C hasta el análisis cromatográfico. La derivatización pre-columna con el reactivo OPA fue realizada para la detección fluorométrica de aminoácidos derivatizados en una estación cromatográfica BAS CC-5/PM-80.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como valores promedio \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (GraphPad Prism 5.0). Los niveles de significancia considerados fueron de $P \leq 0.05$ para todas las pruebas.

6. RESULTADOS

Peroxidación lipídica

La Figura 3 muestra los datos del daño peroxidativo a los lípidos colectados de QUIN sub-tóxico, 3NP sub-tóxico y ambas toxinas en sinaptosomas. Los resultados son de 30 días posteriores a la lesión. La formación de sustancias reactivas al TBA fue utilizado como índice preciso para medir el daño oxidativo a lípidos en membranas sinápticas estriatales de ratas lesionadas con las toxinas antes mencionadas. Cuando se compararon los resultados del grupo control con los administrados con toxinas, se observó que la peroxidación lipídica se ve incrementada en el grupo administrado con ambas toxinas QUIN sub-tóxico + 3NP sub-tóxico con respecto al control ($P < 0.05$), se nota una peroxidación potenciada debido a la participación de ambas toxinas. También se logra observar una diferencia entre los grupos QUIN sub-tóxico y 3NP sub-tóxico que presentan la peroxidación de lípidos reducida en comparación con el grupo administrado con ambas toxinas ($P < 0.05$).

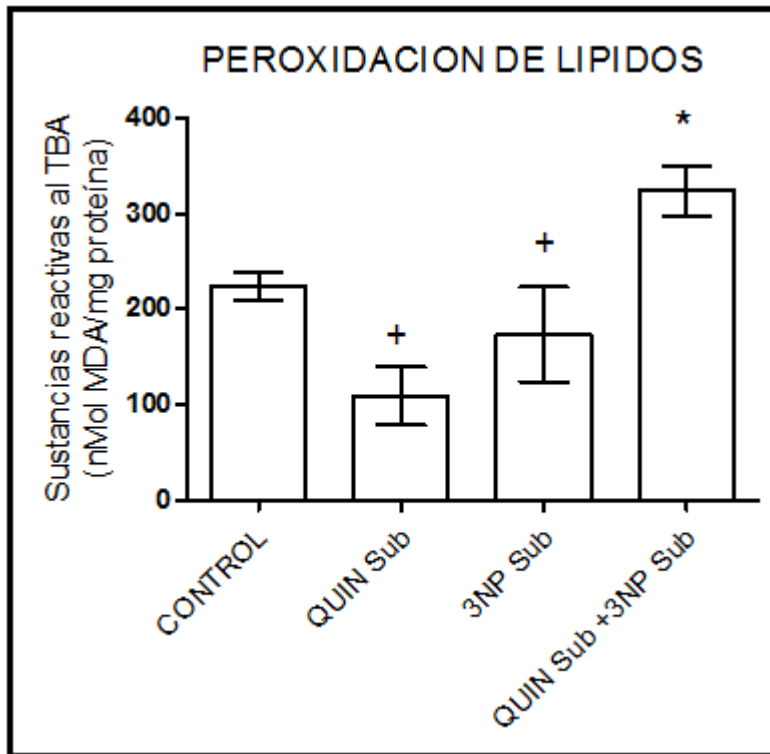


Figura 3. En la gráfica se muestran los resultados de la peroxidación lipídica medida con cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en sinaptosomas estriatales de todos los grupos. Los datos representan los valores promedio \pm SEM de grupos de $n=6$ ratas por grupo. $P<0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. * $P<0.05$ diferencia respecto al grupo control; + $P<0.05$ diferencia respecto al grupo de QUIN + 3NP sub-tóxicos.

Funcionalidad mitocondrial

La Figura 4 representa los datos de la capacidad reductiva mitocondrial obtenida de QUIN sub-tóxico, 3NP sub-tóxico y ambas. Los resultados son de 30 días posteriores a la lesión. Se empleó la reducción de MTT para evidenciar los cambios en la función mitocondrial en membranas sinápticas estriatales de animales lesionados con las toxinas antes mencionadas. La línea base de la actividad mitocondrial fue elegida como 100%. En el grupo administrado con 3NP sub-tóxico se muestra diferencia significativa con respecto al grupo administrado con QUIN sub-tóxico + 3NP sub-tóxico observándose este primer grupo incrementado respecto al segundo.

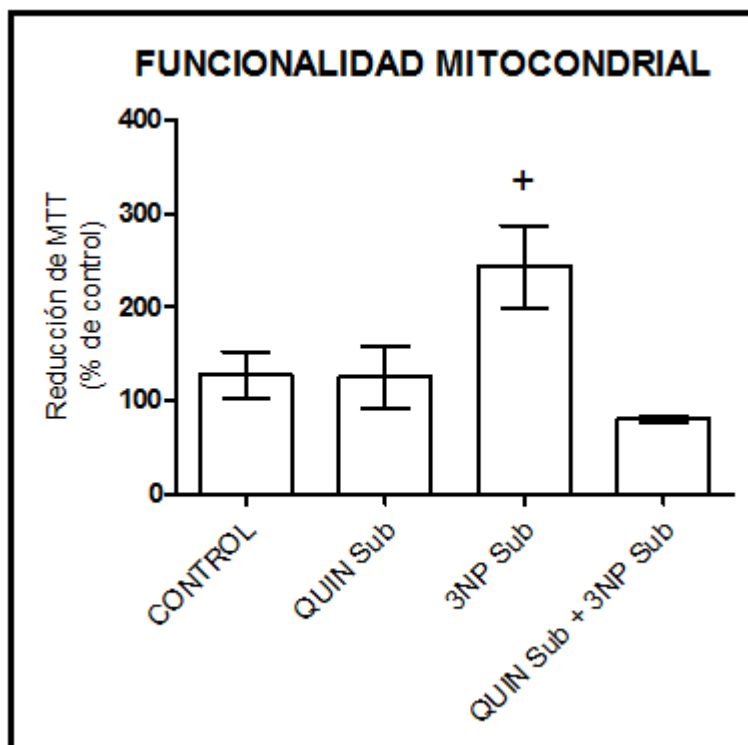


Figura 4. La gráfica representa los resultados de función mitocondrial medida como la cuantificación de reducción de MTT en sinaptosomas estriatales de ratas infundidas estriatalmente y/o intraperitonealmente con solución salina, QUIN, 3NP o ambos. Los datos representan los valores promedio \pm SEM de grupos de $n=6$ ratas por grupo. $P<0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. * $P<0.05$ diferencia respecto al grupo control; + $P<0.05$ diferencia respecto al grupo de QUIN + 3NP sub-tóxicos.

Morfología

La figura 5 muestra los datos de la cuantificación de células dañadas en un campo a partir de cortes coronales tratados previamente con solución salina, QUIN sub-tóxico, 3NP sub-tóxico y ambas toxinas, utilizando la técnica de tinción de hematoxilina-eosina donde se logra ver la morfología de las células neuronales estriatales. Los resultados son de 30 días posteriores a la lesión. Se puede ver que hay diferencia significativa entre el grupo administrado con ambas toxinas en concentraciones sub-tóxicas con respecto al control notándose éste último con menor cantidad de células alteradas; también existen diferencias significativas entre los grupos QUIN sub-tóxico y 3NP sub-tóxico con respecto al grupo administrado con ambas toxinas, donde en éste último se logra ver la actividad potenciada por ambas toxinas.

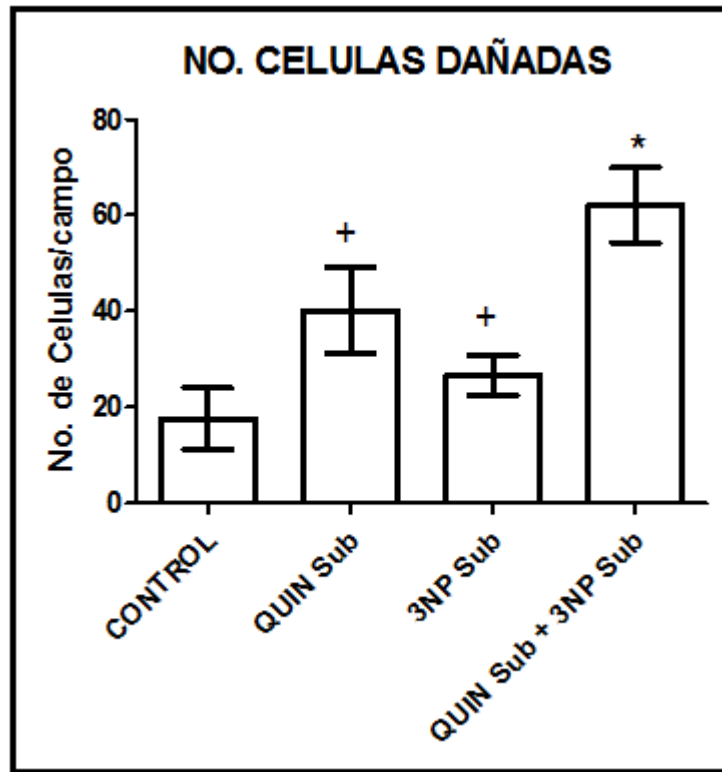
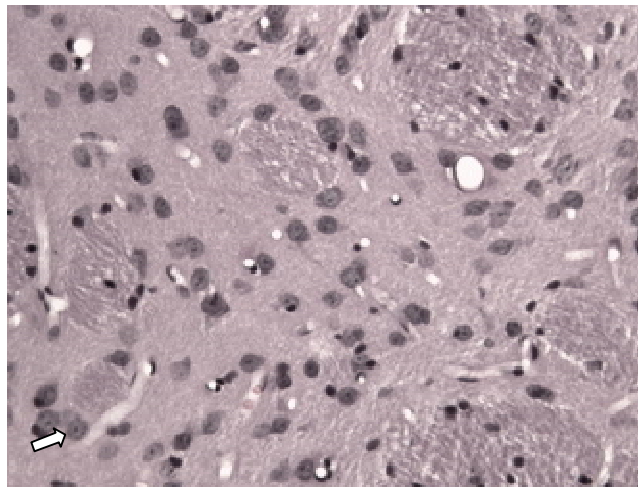
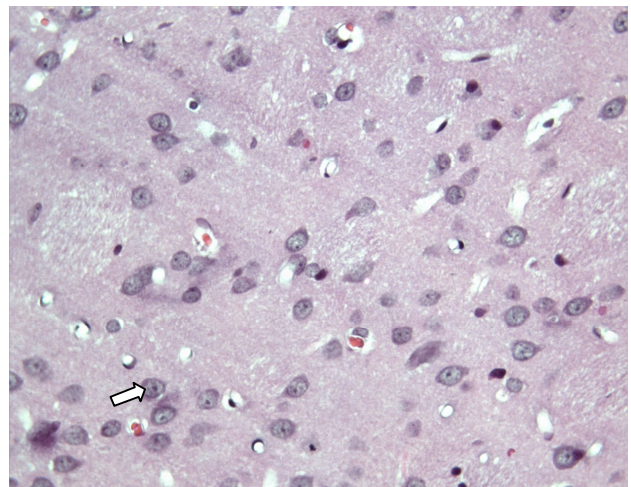


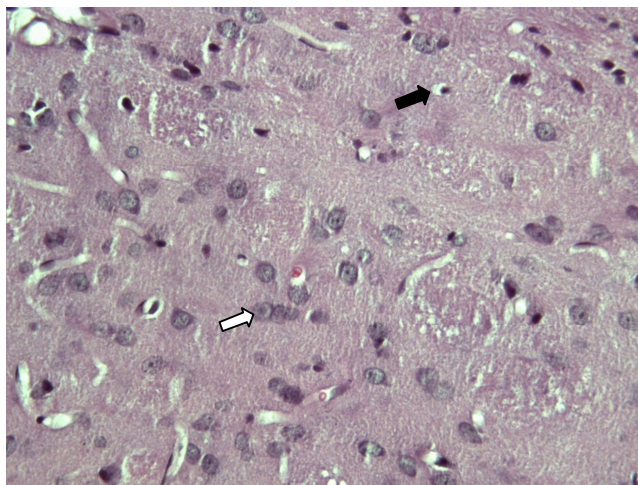
Figura 5. La gráfica representa las células dañadas de ambos estriados, cuantificadas utilizando la técnica de hematoxilina-eosina, con la previa administración de solución salina, 3NP, QUIN o ambos. Los datos representan los valores promedio \pm SEM de grupos de $n=3$ ratas por grupo. $P<0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. * $P<0.05$ diferencia respecto al grupo control; + $P<0.05$ diferencia respecto al grupo de QUIN + 3NP sub-tóxicos.



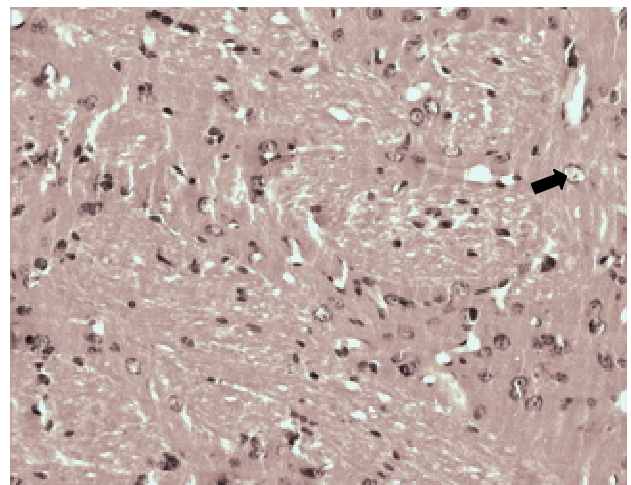
Control



3NP subtóxico



QUIN subtóxico



Co-administración

Figura 6. Fotografías de estriados de rata tomadas a 40X en un microscopio de campo claro. Previamente se realizó una tinción de hematoxilina-eosina. Se cuantificaron las células por campo visual.

Se tomaron como células sanas (marcadas con una flecha blanca) aquellas en las que se podía observar el núcleo íntegro, citoplasma sin degradar y un nucleolo bien definido; por el contrario, las células alteradas (marcadas con una flecha negra) muestran un núcleo poco definido, citoplasma degradado y reducido en tamaño con el nucleolo comprimido.

Cromatografía de fase líquida (HPLC) GABA

La figura 6 representa los datos de la cantidad de GABA estriatal total de QUIN sub-tóxico, 3NP sub-tóxico y la co-administración de las toxinas antes mencionadas de 30 días posteriores a la lesión. Al comparar los resultados de los grupos administrados con toxinas con respecto al control, no se observan diferencias significativas, tampoco se observan diferencias significativas cuando se comparan los grupos QUIN sub-tóxico y 3NP sub-tóxico respecto al grupo administrado con ambas toxinas, pero se observa una ligera disminución de la cantidad de GABA en el grupo administrado con QUIN sub-tóxico + 3NP sub-tóxico comparado con el grupo control.

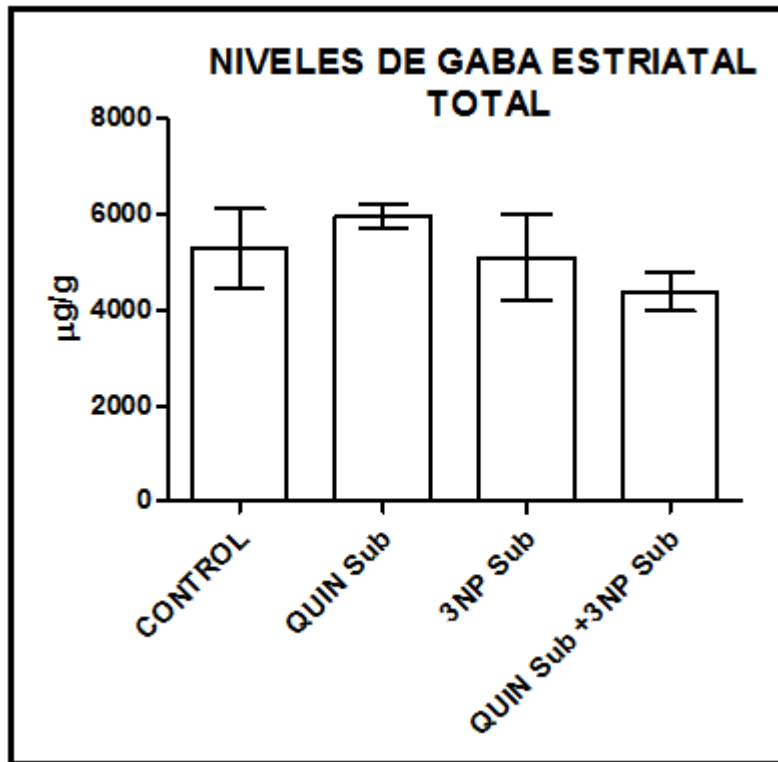


Figura 6. La gráfica muestra los niveles de GABA en µg/g de homogenados de tejido estriatal, lo cuales tuvieron una infusión de solución salina, 3NP, QUIN o ambos. Los datos representan los valores promedio \pm SEM de grupos de $n=3$ ratas por grupo. $P<0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. * $P<0.05$ diferencia respecto al grupo control; + $P<0.05$ diferencia respecto al grupo de QUIN + 3NP sub-tóxicos.

7. DISCUSIÓN

El QUIN es un metabolito endógeno de la vía de la kinurenina, que es la principal vía catabólica del triptófano en el SNC. El QUIN conocido agonista endógeno de los receptores NMDA y se ha demostrado que produce un patrón tóxico parecido al que se observa en distintos desórdenes neurodegenerativos como el de la enfermedad de Huntington cuando es administrado intra-cerebralmente a roedores y primates no humanos (Schwarcz, 1983; Beal *et al.* 1986; Stone, 1993). Sin embargo su efecto tóxico en neuronas ha sido solo parcialmente atribuido al daño excitotóxico ya que se ha demostrado que también responsable de la inhibición de los complejos II y III en el transporte de electrones a nivel mitocondrial, con una consecuente reducción de los niveles de ATP, lo cual puede contribuir a neurodegeneración. (Bordelon *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2006; Schuck *et al.*, 2007). Por otro lado, el ácido 3 nitropropiónico, una micotoxina mitocondrial capaz de inhibir irreversiblemente la succinato deshidrogenasa (SDH) del Complejo II de la cadena de transporte de electrones. Esta toxina también ha mostrado inducir tanto necrosis como apoptosis neuronal dependiendo de la dosis (Pang y Geedes, 1997). Además también puede generar excitotoxicidad secundaria sugiriendo que si se provoca una falla en los niveles de ATP resulta en un metabolismo energético deficiente, el cual conduce a despolarización de la membrana y activación sostenida de los receptores de NMDA por la alteración primaria de las ATPasas Na^+ , K^+ (Novelli *et al.*, 1988; Albin y Greenamyre, 1992; Beal *et al.*, 1995; Pang y Geddes, 1997). Ambas toxinas son ampliamente utilizadas para realizar modelos experimentales tóxicos de la EH, debido a que reproducen algunas de las alteraciones neuroquímicas, y también algunos de los trastornos motores que se observan en esta enfermedad (Pérez De la Cruz *et al.*, 2001). Ambas toxinas tienen mecanismos de acción primarios diferentes, por lo cual previamente se han estudiado los efectos de la administración conjunta de ambas toxinas tanto a dosis tóxicas como sub-tóxicas con la finalidad de establecer si pudieran existir mecanismos de facilitación tóxica.

El modelo de uso conjunto de QUIN y 3-NP ha sido poco estudiado. Algunos marcadores evaluados en él son la peroxidación lipídica y la viabilidad mitocondrial en modelos *in vitro* (Elinos Calderón, *et al* 2009; Pérez de la Cruz, *et al* 2008; Silva Adaya *et al* 2008; Jacquard *et al* 2006); *in vivo*, Jacquard y colaboradores evaluaron algunos marcadores anatómicos e histoquímicos en el 2006 y en el 2008 Silva-Adaya y colaboradores evaluaron la conducta de rotación y los niveles estriatales de GABA, donde se observó una ligera disminución de los niveles de GABA en el modelo de facilitación comparado con los modelos de QUIN y 3NP evaluados individualmente.

Hasta ahora no se conoce con precisión cuáles son los efectos de la administración conjunta de ambas toxinas en concentraciones sub-tóxicas, por lo cual este trabajo se centró en investigar si existe alguna facilitación tóxica al administrarlas local y sistémicamente en ratas midiendo distintos parámetros neuroquímicos a los 30 días de los tratamientos.

En este trabajo encontramos una evidente facilitación tóxica con la administración del QUIN y 3NP a dosis sub-tóxicas al observar un incremento en los niveles de PL en sinaptosomas estriatales, lo cual coincide con lo reportado anteriormente por Reynolds Jr NC, *et al.*, 1997, donde se puede observar que produce daño oxidativo en membranas sinaptosomales al administrarse en conjunto, esto sugiere que el desbalance en la fosforilación oxidativa puede estar incrementado por la excitotoxicidad mediada por la sobre-activación de los receptores NMDA y viceversa. A este respecto existen estudios previos que demuestran que la co-administración sub-tóxica de de malonato (un inhibidor mitocondrial irreversible) incrementa lesiones en el cerebro producidas por moléculas excitatorias como L-Glu, NMDA y alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), indicando que el malonato incrementa la vulnerabilidad a través de la excitotoxicidad (Greene y Greenamyre, 1995).

Por otro lado, en la funcionalidad mitocondrial se puede observar que el grupo administrado con ambas toxinas no muestra una diferencia significativa con respecto al control, pero sí tiene una tendencia a reducirse, dichos resultados pueden indicar que la potenciación del daño evocado por ambas toxinas no es de

suficiente magnitud para afectar de forma significativa la funcionalidad mitocondrial o por otro lado, puede deberse a que las determinaciones de funcionalidad se realizaron después de 30 días de la administración de las toxinas lo cual hace menos específico su efecto sobre la funcionalidad mitocondrial.

Los defectos mitocondriales incrementan la neurodegeneración mediada por la activación de los receptores de NMDA a través de un incremento en los niveles de Ca^{2+} que provienen de fuentes intracelulares; la disminución de la energía, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo pueden producir simultáneamente para producir neurotoxicidad. En un estudio previo se observó que al administrar ambas toxinas en concentraciones sub-tóxica no se observó potenciación de la actividad de ambas, sin embargo, al administrar concentraciones incrementadas de L-Car a las fracciones sinaptosomales tratadas con QUIN + 3NP, resultó en una recuperación dependiente de la concentración de la reducción de MTT, lo cual sugiere que la L-Car pudo estar actuando a nivel metabólico para disminuir la disfunción mitocondrial en el modelo evocado por QUIN + 3NP (Silva-Adaya, et al., 2008). También observamos que la funcionalidad mitocondrial se ve incrementada en el grupo de 3NP sub-tóxico, esto puede haber ocurrido por un acondicionamiento sub-agudo que provee resistencia al daño isquémico al tejido nervioso (Brambrink *et al.*, 2004), donde después de administrar la toxina en una ocasión, la célula se prepara con una actividad mitocondrial constante en caso de recibir un ataque posterior.

Al cuantificar el número de células dañadas, logramos observar que el grupo de interés QUIN + 3NP demuestra un incremento del número de células dañadas en comparación con el control, se puede notar una potenciación de ambas toxinas, ya que éstas en concentraciones sub-tóxicas de forma individual se conservan por debajo del grupo co-administrado. En el grupo QUIN se observó un mayor número de células dañadas posiblemente debido a que estos animales recibieron la administración de la toxina por inyección intraestriatal, mientras que el 3NP fue administrado por vía sistémica. Desde que la excitotoxina QUIN se debe administrar por inyección intraestriatal para producir los cambios patológicos correspondientes a los del cuerpo estriado en la EH (Bazzet TJ *et al.*, 1993), se ha

sugerido que es igualmente importante administrar 3NP también por inyección intraestriatal para mantener la vulnerabilidad selectiva del cuerpo estriado (Ludolph A C *et al.*, 1991).

La medición de GABA total estriatal nos muestra valores más o menos similares, el grupo co-administrado con QUIN y 3NP presenta una tendencia a reducir los niveles de GABA, sin embargo no hay diferencia significativa comparada con el grupo control. El grupo QUIN se nota un poco elevado con respecto al control. Se observó en un estudio que en el grupo de QUIN hubo una disminución de las concentraciones de GABA estriatal seguido de un ligero incremento, lo cual se comenta, representa el mismo patrón básico de eventos visto en el cuerpo estriado con daño citotóxico siguiendo daños excitotóxicos iniciales (Silva-Adaya *et al.*, 2008). Estudios de microdiálisis con NMDA muestran que la principal causa de liberación de GABA en el cuerpo estriado es debido a un mecanismo de receptor directo (Young AMJ y Brardford HF, 1993). En adición un número de membranas despolarizadas y bloqueadores de canales iónicos en estudios de microdiálisis en pálido ventral sugieren que la mitad del GABA basal extracelular es derivado de mecanismos dependientes de Ca^{2+} o Na^{+} (Bourdelaís y Kalivas, 1992). Los gradientes reversibles de Na^{+}/K^{+} a través de la membrana celular en un ambiente agotado energéticamente puede conducir a una liberación de glutamato, conduciendo a flujo de calcio y a una máxima secreción de GABA con eventual daño citotóxico de manera similar a lo observado en isquemia (Graham *et al.*, 1993).

Bazzet *et al.* (1996) demostraron un efecto sinérgico de QUIN y malonato en lesiones neuronales producidas por la combinación de estas toxinas, y su efecto fue bloqueado por el antagonista de los rNMDA MK-801, por lo tanto asumiendo que el flujo de calcio extracelular representa un importante factor que conduce a daño neuronal. Se sabe que ambas toxinas son capaces de incrementar los niveles de calcio intracelular, también produciendo disfunción mitocondrial, formación de ERO y la futura activación de proteasas (Santamaría y Rios, 1993; Zeevalk *et al.*, 1995; Brouillet *et al.*, 1999; Sas *et al.*, 2007).

Con un metabolismo oxidante reducido y una despolarización parcial de la membrana celular, los canales iónicos del receptor NMDA pueden ser más fácilmente activados (Beal, M.F., 1992). Ciertos trabajos parecidos al presente, en los cuales se utilizan de manera conjunta agonistas del receptor NMDA, como NMDA, AMPA y L-Glutamato, y toxinas mitocondriales, como el malonato, exponen que hay un evento de potenciación o sinergismo al administrar dosis subtóxicas de dichas toxinas, tomando como marcador el grado de lesión estriatal (Greene, J. and Greenamyre, J. 1995; Bazzett, J. *et al.* 1996). Adicionalmente, otros procesos envueltos en la regulación del calcio intracelular pueden verse afectados (Beal, M.F., 1992), como lo explica el trabajo de Jacquard y colaboradores del 2006, en el cual se argumenta que una moderada activación del receptor NMDA combinada con defectos no tóxicos de la SDH mitocondrial (inhibición de la SDH >35%) pueden disparar de manera sinérgica una degeneración estriatal masiva (Jacquard *et al.*, 2006).

Los resultados del proyecto generarán información sobre la reproducibilidad de algunos eventos tóxicos en animales en comparación con las características de la EH, proporcionando así información relevante para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el manejo de enfermedades neurodegenerativas.

8. CONCLUSIÓN

El modelo de administración conjunta de QUIN y 3NP en concentraciones subtóxicas puede servir como herramienta para evaluar procesos de degeneración celular vistos en enfermedades neurodegenerativas como lo son la enfermedad de Huntington, Alzheimer, Parkinson, etc., ya que este modelo reproduce algunas características patológicas de estas enfermedades.

Este modelo de facilitación tóxica nos muestra que la administración de sub-tóxica de ambas toxinas produce la peroxidación de lípidos membranales, alteración en la morfología neuronal y en la funcionalidad mitocondrial, sin embargo los niveles de GABA no se muestran alterados. Estos datos podrían repetirse en un futuro con inyecciones estriatales de ambas toxinas y medirse repetidas veces, para que los experimentos sean más homogéneos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Albin, R. L., and Greenamyre, J. T. 1992. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 42, 733–738
- ✓ Alexi T., Hughes P. E., Knusel B. and Tobin A. J. 1998. Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatalapoptosis in Sprague–Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp. Neurol.* 153: 74–93.
- ✓ Almeida A, Almeida J, Bolanos JP, Moncada S. 2001. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98:15294–9.
- ✓ Alston T. A., Mela L. and Bright H. J. 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74, 3767–3771.
- ✓ Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., and Nicotera, P. 1995. Glutamateinduced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961–973
- ✓ Bazzett TJ, Becker JB, Kaatz KW, Albin RL. 1993. Chronic intrastriatal dialytic administration of quinolinic acid produces selective neural degeneration. *Exp. Neurol.* 120:177-185.
- ✓ Bazzett, T.J., Falik, R.C., Becker, J.B. & Albin, R.L. 1996. Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the rat striatum. *Brain. Res.*, 718, 228–232.
- ✓ Beal, M. F., Kowall, N.W., Ellison, D. W., Mazurek, M.F., Swartz, K. J., y Martin, J.B.1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington´s disease by quinolinic acid. *Nature*, 321:168-171.
- ✓ Beal M. F. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31, 119–130.

- ✓ Beal M.F, Matson W.R, Storey E, Milbury P, Ryan E.A, Ogawa T, Bird E.D. 1992. Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J Neurol Sci* 108:80-87.
- ✓ Beal, M. F. 1992. Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 657–662
- ✓ Beal, M. F. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6, 3338–3344
- ✓ Beal M.F., Brouillet E., Jenkins B., Hensha W.R., Rosen B. y Hyman B.T. 1993. Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J. Neurochem.*, 61, 11147-1150.
- ✓ Beal M.F. 2005. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in neurological diseases. Neuroscience Intelligence Unit R. G. Landes Company. Springer Verlag. Heidelberg.
- ✓ Bernardi P., Colonna R., Costantini P., Eriksson O., Fontaine E., Ichas F., Massari S., Nicolli A., Petronilli V y Scorrano L. 1998. The mitochondrial permeability transition. *Biofactors*, 8, 273-281.
- ✓ Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.*, 79, 1127-1155.
- ✓ Bizat N, Hermel J M, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S y Brouillet E. 2003. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23:5020-5030.
- ✓ Blum D., Galas M. C., Gall D., Cuvelier L. and Schiffmann S. N. 2002. Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 10:410–426.
- ✓ Blum D., Gall D., Galas M. C., d'Alcantara P., Bantubungi K. and Schiffmann S. N. 2002. The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions

- and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J. Neurosci.* 22: 9122–9133.
- ✓ Bordelon Y. M., Chesselet M. F., Nelson D., Welsh F., Erecinska M. 1997. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69:1629-1639.
 - ✓ Borlongan C.V, Koutouzis T.K, Sanberg P.R. 1997. 3-nitropropionic acid animals model and Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 21:289-293.
 - ✓ Bourdelais AJ, Kalivas PW. 1992. Modulation of extracellular g-aminobutyric acid in the ventral pallidum using in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 58:2311-2320.
 - ✓ Brambrink AM, Noga H, Astheimer A, Heimann A y Kempfski O. 2004. pharmacological preconditioning in global cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl.* 89: 63-66.
 - ✓ Brennan W.A, Bird E.D, Aprille J.R. 1985. Regional Mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem* 44:1948-1950.
 - ✓ Brouillet E, Guyot M C, Mittoux, Altairac S, Conde F, Palfi S y Hantraye. 1998. Partial inhibition brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70:794-805
 - ✓ Brouillet E., Conde F., Beal M. F. and Hantraye P. 1999. Replicating disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59, 427–468.
 - ✓ Brouillet E., Carine Jacquard, Nicolas Bizat and David Blum. 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry.* 95, 1521-1540.
 - ✓ Browne S. E., Bowling A. C., MacGarvey U., Baik M. J., Berger S. C., Muqit M. M., Bird E. D. y Beal M. F. 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41, 646–653.

- ✓ Browne S.E., y Beal M.F. 2002. Toxin-induced mitochondrial dysfunction. *Int. Rev. Neurobiol.*, 53, 243-279
- ✓ Butterworth J., Yates C. M. and Reynolds G. P. 1985. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in postmortem brain from Huntington's disease and agonal cases.
- ✓ Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Greengard, P., Hipskind, R. A., Borrelli, E., and Bernardi, G. 2001. Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 21, 5110–5120
- ✓ Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Crovetto F y Kratzing C. 1974. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6, 361-371.
- ✓ Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. 2004. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* 25:125–39.
- ✓ Coles C. J., Edmondson D. E. and Singer T. P. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 254, 5161–5167
- ✓ Choi, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.
- ✓ Cudkowicz M.E., Sexton P.M., Ellis T., Hayden D.L., Gwilt P.R., Whalen J. y Brown Jr R.H. 1999. The pharmacokinetics and Pharmacodynamics of procysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 52, 1492-1494.
- ✓ Curzon, G. 1996. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 398, 27.
- ✓ Davey GP, Canevari L, Clark JB. 1997. Threshold effects in synaptosomal and nonsynaptic mitochondria from hippocampal CA1 and paramedian neocortex brain regions. *J Neurochem*; 69:2564–70.

- ✓ De Carvalho, L.P., Bochet, P., Rossier, J., 1996. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunit. *Neurochem. Int.* 28, 445–452.
- ✓ During M. J., Heyes M. P., Freese A., Markey S.P., Martin J. B., Roth R. H. 1989. Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading. *Brain Res* 476:384-387.
- ✓ Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M. 1993. Trinucleótido repeat length instability and age of onset in Huntington´s disease. *Nat Genet* 4:387-392.
- ✓ El-Defrawy S. R., Boegman R. J., Jhamandas K., Beninger R. J. 1986. The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol* 64:369-375.
- ✓ Elinos-Calderon D, Robledo-Arratia Y, Pérez De La Cruz V, Maldonado P D, Galván-Arzate Sonia, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. 2009. Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine. *J Neural Transm*: 702, 10p.
- ✓ Ellerby L M. 2002. Huntingtin for excitement: NMDA receptors in Huntington´s disease. *Neuron* 33:841-842.
- ✓ Esterbauer H, Schaur R J y Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol and Med.* 11: 81-128.
- ✓ Fan, M.M., Raymond, L.A. 2007. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 272–293.
- ✓ Farber NB, Wozniak DF, Price MT, Labruyere J, Huss J, St Peter H, Olney JW. 1995. Age specific neurotoxicity in the rat associated with NMDA receptor blockade: potential relevance to schizophrenia? *Biol Psychiatr* 38:788-796.

- ✓ Foster A. C., Collins J. F., Swarcz R. 1983. On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3.piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology* 22:1331-1342.
- ✓ Foster, A.C., Vezzani, A., French, E.D., Swarcz, R., 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 48, 273–278.
- ✓ Galindo M.F., Jordan J., González-García C., y Ceña V. 2003. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br. J. Pharmacol.*, 139, 797-804.
- ✓ Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. 2005. *Trends Pharmacol Sci* 26:190–5.
- ✓ Garthwaite, G., Hajos, F., Garthwaite, J., 1986. Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 18, 437–447.
- ✓ Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:957–9.
- ✓ González, C., y Santamaría, A. 2007. Quinolinic acid, Huntington´s disease and inflammatory events in the brain. *Research signpost.* 37-60.
- ✓ Gould D. H. and Gustine D. L. 1982. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8, 377–393.
- ✓ Gould D. H., Wilson M. P. and Hamar D. W. 1985. Brain enzyme and clinical alterations induced in rats and mice by nitroaliphatic toxicants. *Toxicol. Lett.* 27, 83–89.
- ✓ Graham SH, Chen J, Sharp FR, Simon RP. 1993. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory aminoacid release. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13:88-97.

- ✓ Gramsbergen, J.B.; Hodgkins, P.S.; Rassoulpour, A.; Turski, W.A.; Guidetti, P.; Schwarcz, R. 1997. Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. *J. Neurochem.*, 69, 290.
- ✓ Greene J.G y Greenamyre J.T. 1995. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J. Neurochem.*, 64, 430-436.
- ✓ Greene J.G y Greenamyre J.T. 1996. Manipulation of membrane potential modulates malonate –induced striatal excitotoxicity *in vivo*. *J Neurochem.*, 66, 637-643
- ✓ Greene, J. G., and Greenamyre, J. T. 1996. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* 48, 613–634.
- ✓ Greene J. G., Sheu S. S., Gross R. A. and Greenamyre J. T. 1998. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* 84, 503–510.
- ✓ Gu M., Gash M. T., Mann V. M., Javoy-Agid F., Cooper J. M. y Schapira A. H. 1996. Mitochondrial defect in Huntington’s disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39, 385–389.
- ✓ Guidetti P, Luthi-Carter R.E, Augood S.J, Schwarcz R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington’s disease. *Neurobiol Dis* 17:455-461.
- ✓ Guillemin, G.J.; Kerr, S.J.; Smythe, G.A.; Smith, D.G.; Kapoor, V.; Armati, P.J.; Croitoru, J.; Brew, B.J. *J. Neurochem.*, 2001, 78, 842.
- ✓ Hamilton B. F. and Gould D. H. 1987. Correlation of morphologic brain lesions with physiologic alterations and blood–brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 74, 67–74.
- ✓ Hamilton B. F. and Gould D. H. 1987. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 72, 286–297.
- ✓ Harmand D. 1993. Free radicals and age-related diseases. In *Free radicals in aging*. YB PAL(ed), CRC Press, Boca Raton, FL, pp 205-222.

- ✓ The Huntington's Disease Collaborative Research Group (H.D.C.R.G). 1993. (Huntington's disease collaborative research group): A novel gene containing a trinucleotide repeat is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971-983.
- ✓ He F., Zhang S., Qian F. and Zhang C. 1995. Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology* 45, 2178–2183.
- ✓ Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1410:215–28.
- ✓ Henry P. G., Lebon V., Vaufrey F., Brouillet E., Hantraye P. and Bloch G. 2002. Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* 82:857–866.
- ✓ Henshaw R., Jenkins B.G., Schulz J.B., Ferrante R.J., Kowall N.W., Rosen B.R y Beal M.F. 1994. Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation. *Brain. Res.*, 647, 161-166.
- ✓ Hirata, F.; Hayaishi, O. 1971. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J. Biol. Chem.*, 246, 7825.
- ✓ Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. 2004. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25:259–64.
- ✓ Hynd M R, Scott H L y Dodd P R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Internat.* 45: 583-595.
- ✓ Jacqard C., Trioulier Y., Cosker F., Escartin C., Bizat N., Hantraye P., Cancela JM., Bonvento G. y Brouillet E. 2006. Brain mitochondrial defects amplify intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ rise and neurodegeneration but not Ca^{2+} entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.* 20, E245-E259.

- ✓ Janavs J. L. y Aminoff M. J. 1998. Dystonia and chorea in acquired systemic disorders. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 65, 436–445.
- ✓ Jenkins B. G., Rosas H. D., Chen Y. C., Makabe T., Myers R., Mac-Donald M., Rosen B. R., Beal M. F. and Koroshetz W. J. 1998. ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 50, 1357–1365.
- ✓ Jordan J., Ceña V. y Prehn J.H. 2003. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J physiol Biochem* 59:129-142.
- ✓ Keller J N, Kindy M S, Holtsberg F W, St. Claire D K, Yen H C, Germeyer A, Steiner S M, Bruce-Keller A J, Hutchins J B y Mattson M P. 1998. Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Prevents Neural Apoptosis and Reduces Ischemic Brain Injury: Suppression of Peroxynitrite Production, Lipid Peroxidation, and Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Neuroscience* 15: 687-697.
- ✓ Kohler, C.; Okuno, E.; Flood, P.R.; Schwarcz, R. 1987. Quinolinic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3491.
- ✓ Kohler, C.; Eriksson, L.G.; Okuno, E.; Schwarcz, R. 1988. Localization of quinolinic acid metabolizing enzymes in the rat brain. Immunohistochemical studies using antibodies to 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Neuroscience*, 27, 49.
- ✓ Koroshetz W. J., Jenkins B. G., Rosen B. R. and Beal M. F. 1997. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Ann. Neurol.* 41, 160–165.
- ✓ Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., and Bockaert, J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364, 535–537
- ✓ Laforet, G. A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F. M., Campbell, M., Cadigan, B. A., Warzecki, L., Tagle, D. A., Reddy, P. H., Cepeda, C., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Klapstein, G. J., Ariano, M. A., Levine, M. S., DiFiglia, M., and Aronin, N. 2001. Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 21, 9112–9123

- ✓ Lees G.J. 1993. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54:287-322.
- ✓ Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, Kalman B. 2001. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 177:95–103.
- ✓ Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 1991. 3-nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxic and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* 18:492-498.
- ✓ Martin R.L, Lloyd H.E, Cowan A.I. 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17:251-257.
- ✓ McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V., 1988. Neurotoxicity of N-methyl-Daspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 459, 200–203.
- ✓ Monaghan, D.T., Beaton, J.A., 1991. Quinolinate differentiates between forebrain and cerebellar NMDA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 194, 123–125.
- ✓ Munn, D.H.; Zhou, M.; Attwood, J.T.; Bondarev, I.; Conway, S.J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A.L. 1998. *Science*, 281, 1191.
- ✓ Müller, A.C., Dairam, A., Limson, J.L., Daya, S., 2007. Mechanisms by which acyclovir reduces the oxidative neurotoxicity and biosynthesis of quinolinic acid. *Life Sci.* 80, 918–925.
- ✓ Nadler, J.V., Evenson, D.A., Cuthbertson, G.J. 1981. Comparative toxicity of kainic acid and other acidic amino acids toward rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 6, 2505–2517.
- ✓ Nakao, N., Grasbon-Frodl, E.M., Widner, H., Brundin, P. 1996. Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience* 73, 185–200.
- ✓ Nishikimi, M. 1975. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 92.

- ✓ Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayamak K, Wolf G. 1998. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neural and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration. Relation to oxidative and nitrenergic stress. *Glia* 23:285-297.
- ✓ Novelli, A., Reilly, J. A., Lysko, P. G., and Henneberry, R. C. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-Daspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451, 205–212
- ✓ Okamoto, H.; Yamamoto, S.; Nozaki, M.; Hayaishi, O. 1967. On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 26, 309.
- ✓ Okuno, E.; Kohler, C.; Schwarcz, R. 1987. Rat 3-hydroxyanthrdnilic acid oxygenase: purification from the liver and immunocytochemical localization in the brain. *J. Neurochem.*, 49, 771.
- ✓ Okuno, E.; Kido, R. 1991. Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 294, 167.
- ✓ Ozaki, Y.; Nichol, C.A.; Duch, D.S. 1987. *Arch. Biochem. Biophys.*, 257, 207.
- ✓ Pang, Z. & Geddes, J.W. 1997. Mechanisms of cell death induced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.*, 17, 3064–3073.
- ✓ Panov A. V., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., Hayden M. R., Burke J. R., Strittmatter W. J. and Greenamyre J. T. 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 5, 731–736.
- ✓ Pláteník, J., Stopka, P., Vejrazka, M., Stípek, S., 2001. Quiniolinic acid–iron(II) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction. *Free Radic. Res.* 34, 445–459.
- ✓ Peng, T. I., Jou, M. J., Sheu, S. S., and Greenamyre, J. T. 1998. Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp. Neurol.* 149, 1–12

- ✓ Pérez-De La Cruz, V., González-Cortés, C., Galván-Arzate, S., Medina-Campos, O.N., Pérez-Severiano, F., Ali, S.F., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A., 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20- tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron(III). *Neuroscience* 135, 463–474.
- ✓ Perez-De La Cruz V, Gonzalez-Cortes C, Galvan-Arzate S, Medina-Campos O.N, Perez-Severiano F, Ali S.F, Pedraza-Chaverri J y Santamaría A. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective rol of iron porphyrinate 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III).*Neuroscience* 135:463-474.
- ✓ Pérez, V., y Santamaría, A. 2007. Integrative Hypothesis for Huntington's Disease: A Brief Review of Experimental Evidence. *Phy. Res.* 513-526.
- ✓ Pérez de la Cruz V., Mina Konigsberg, Pedraza-Chaverri J., Herrera-Mundo, N., Díaz-Muñoz M., Morán J., Fortoul-van der Goes T., Rondán-Zárate A., Maldonado P. D., Ali S. F. y Santamaría A. 2008. Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic/energetic deficit synergic model in rats. *European Journal of Neurochemistry*. Vol. 27, pp. 1075-1085.
- ✓ Rami, A., Ferger, D., Krieglstein, J. 1997. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res* 93-97.
- ✓ Reynolds, I. J., and Hastings, T. G. 1995. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 15, 3318–3327
- ✓ Reynolds Jr N C, Lin W, Meyer-Cameron C, Roerig D L. 1997. Differential responses of extracellular GABA to intrastriatal perfusions of 3-nitropropionic acid and quinolinic acid in the rat. *Brain Res.* 778: 140-149.
- ✓ Ribeiro C.A, Grando V, Dutra Filho C.S, Wannmacher C.M y Wainer M. 2006. Evidence that Quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J. Neurochem* 99:1531-1542

- ✓ Riobo NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, et al. 2002. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 277:42447–55.
- ✓ Rios, C., Santamaria, A., 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* 16, 1139–1143.
- ✓ Roberts, R.C.; Du, F.; McCarthy, K.E.; Okuno, E.; Schwarcz, R. 1992. Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 326, 82.
- ✓ Roberts, R.C.; McCarthy, K.E.; Du, F.; Ottersen, O.P.; Okuno, E.; Schwarcz, R. 1995. 3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate-containing axon terminals in the rat striatum. *J. Neurosci.*, 15, 1150.
- ✓ Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436–439.
- ✓ Roitberg B. Z., Emborg M. E., Sramek J. G., Palfi S., Kordower J. H. 2002. Behavioral and morphological comparison of two nonhuman primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery* 51:852-853.
- ✓ Ryu JK, Kim S.U, Mc Larnon J.G. 2004. Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp. Neurol* 187:150-159.
- ✓ Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E., Nixon, R. A. 1993. Widespread activation of calcium-activated neural proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2628-2632.
- ✓ Santamaría, A., y Jiménez, M. E. 2005. Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview *Curr. Top. Neurochem.*, 4, 1.
- ✓ Santamaría D, Espinoza-Gonzalez V, Rios C, Santamaría A. 1999. N^ω-Nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic

acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices. *Neurochem Res* 24: 843-848.

- ✓ Santamaría A., Ríos 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.
- ✓ Santamaría A, Jimenez-Capdeville M.E, Camacho A, Rodriguez-Martinez E, Flores A, Galvan-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12:2693-2696.
- ✓ Saito, K.; Nowak, T.S. Jr.; Markey, S.P.; Heyes, M.P. 1992. *J. Neurochem.*, 60, 180.
- ✓ Santamaría, A., Ríos, 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.
- ✓ Santamaría, A., Jiménez-Capdeville, M.E., Camacho, A., Rodríguez-Martínez, E., Flores, A., Galván-Arzate, S., 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12, 2693–2696.
- ✓ Santiago-López, D., Vázquez-Román, B., Pérez-de La Cruz, V., Barrera, D., Rembao, D., Salinas-Lara, C., Pedraza-Chaverri, J., Galván-Arzate, S., Ali, S.F., Santamaría, A., 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54, 233–238.
- ✓ Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Jou. Neu. Sciences.* 257:221-239.
- ✓ Sawa A., Wiegand G. W., Cooper J., Margolis R. L., Sharp A. H., Lawler J. F. Jr, Greenamyre J. T., Snyder S. H. and Ross C. A. 1999. Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat. Med.* 5, 1194–1198.

- ✓ Schmidt W, Wolf G, Calk A.J, Schmidt H.H. 1995. Evidence for bidirectional changes in nitric oxide synthase activity in the rat striatum after excitotoxicity (quinolinic acid) induced degeneration. *Neuroscience* 67:345-356.
- ✓ Schuck P.F, Tonin A, Da Costa Ferreira G, Rosa R.B, Latini A, Balestro F, Perry M.L, Wannmancher C.M, De Souza Wyse A.T y Wainer M. 2007. In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. *Neurosci. Res* 57:277-288.
- ✓ Schwarcz R., Whetsell Wo J. R., Mangano R. M.1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-319.
- ✓ Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. 2009. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog. in Neur.* 16p.
- ✓ Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213–9.
- ✓ Siesjo, B.K. 1981. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 155-185.
- ✓ Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo M N, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali S F y Santamaría A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J. of Neurochem.* 105:677-689.
- ✓ Simpson, J. R., and Isacson, O. 1993. Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp. Neurol.* 121, 57–64
- ✓ Smith M A, Hirai K, Hsiao K, Pappolla M A, Harris P L R, Siedlak S L, Tabaton M y Perry G. 1995. Amyloid- β Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated with Oxidative Stress. *Journal of Neurochem.* 70:2212-2215.
- ✓ Stahl W. L. and Swanson P. D. 1974. Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology* 24: 813–819.

- ✓ Stewart VC, Heales SJ. 2003. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* 34:287–303.
- ✓ Stípek, S., Stastný , F., Pláteník, J., Crkovská , J., Zima, T., 1997. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem. Int.* 30, 233–237
- ✓ Stone, T.W. 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog. Neurobiol.*, 64, 185
- ✓ Stone T. W. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45:309-379.
- ✓ Stone, T.W. 1993. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Pharmacol. Rev.*, 1: 275-281.
- ✓ Stone, T.W.; Darlington, L.G. 2002. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1, 609.
- ✓ Strauss K.A y Morton D.H. 2003. Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 121, 53-70.
- ✓ Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H., and Liu, Y. F. 2001. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J. Biol. Chem.* 276, 24713–24718
- ✓ Tabrizi S. J., Cleeter M. W., Xuereb J., Taanman J. W., Cooper J. M. y Schapira A. H. 1999. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann. Neurol.* 45, 25–32.
- ✓ Takikawa, O. 2005. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 12.
- ✓ Taniguchi, T.; Sono, M.; Hirata, F.; Hayaishi, O.; Tamura, M.; Hayashi, K.; Iizuka, T.; Ishimura, Y. 1979. *J. Biol. Chem.*, 254, 3288.
- ✓ The Huntington's disease society of America: physical and occupational therapy for Huntington's disease. 2006. www.hdsa.org.

- ✓ Thomas, S.R.; Mohr, D.; Stocker, R. 1994. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon- γ -primed mononuclear phagocytes *J. Biol. Chem.*, 269, 14457.
- ✓ Virág L. 2005. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 3:209–14.
- ✓ Ward, M. W., Kushnareva, Y., Greenwood, S., and Connolly, C. N. 2005. Cellular and subcellular calcium accumulation during glutamate-induced injury in cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 92, 1081–1090
- ✓ Weller, M., and Paul, S. M. 1993. 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 248, 223–228
- ✓ White, R. J., and Reynolds, I. J. 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* 16, 5688–5697
- ✓ Young AMJ, Bradford HF. 1993. *N*-methyl-D-aspartate- aspartate releases γ -aminobutyric acid from rat striatum in vivo: a microdialysis study using a novel preloading method. *J. Neurochem.* 60:487-492.
- ✓ Zeevalk G. D. and Nicklas W. J. 1990. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1285–1292.
- ✓ Zeevalk G. D. and Nicklas W. J. 1992. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* 59, 1211–1220.
- ✓ Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Brundin, P., Hayden, M. R., and Raymond, L. A. 2002. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33, 849–860
- ✓ Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. 2006. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 109:33–41.

