



03068
16
26

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION SISTEMICA DE LA
D,L- KINURENINA Y DEL PROBENECID SOBRE LA
NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR EL ACIDO QUINOLINICO
EN EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

México, D.F.

1995



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 está 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.

Efecto de la administración sistémica de la D,L-kinurenina y del probenecid sobre la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico en el cuerpo estriado de la rata

T E S I S

Que presenta:

ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

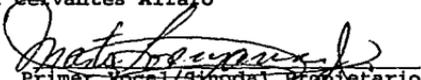
Aprobada por:



Presidente del Jurado/Sinodal Propietario
Dr. José Miguel Cervantes Alfaro

L. Camilo Ríos Castañeda

Secretario/Sinodal Propietario
Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda



Primer Vocal/Sinodal Propietario
Dr. Marta Lorenzana Jiménez

M. Díaz Muñoz

Primer Sinodal Suplente
Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Silvia L. Cruz Martín C.

Segundo Sinodal Suplente
Dra. Silvia L. Cruz Martín C.

C R E D I T O S

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", S.S., bajo la dirección del Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda. El trabajo recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (clave 3525-M) y del Proyecto Académico de Maestría en Ciencias Fisiológicas (clave CF-030001).

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero y profundo agradecimiento a las siguientes personas, quienes contribuyeron sustancialmente al desarrollo de este trabajo con sus ideas, comentarios y propuestas, así como con su apoyo, paciencia y tiempo:

- Al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda, Director de Tesis,

- A los Doctores José Miguel Cervantes Alfaro, Marte Lorenzana Jiménez, Mauricio Díaz Muñoz y Silvia L. Cruz Martín C., Jurado Evaluador del Trabajo de Tesis,

- A las autoridades del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", especialmente a la Subdirección General de Investigación,

- A la Coordinación del Programa Académico de Maestría y Doctorado en Ciencias Fisiológicas de la U.A.C.P. y P., C.C.H., U.N.A.M.

- A mis compañeros de trabajo, miembros del Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez",

- A mis compañeros y profesores en la Maestría en Ciencias Fisiológicas de la U.A.C.P. y P., C.C.H., U.N.A.M.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a las siguientes personas, sin cuyo apoyo incondicional, la realización del mismo no hubiera sido posible:

- A Sonia, mi esposa, mi inspiración;
- A mi madre, mi gran amiga;
- A mi padre, por sus sabios consejos;
- A Daniel, más que un hermano, un amigo;
- A Eduardo y Minerva, por su ejemplo;
- A mis sobrinos América, Mariana, Leopoldo, Alvaro y Rodrigo, a quienes quiero entrañablemente;
- A Isabel, siempre presente en mi mente;
- A mi tío Roberto, a Victoria y Mariana, mi pequeña familia;
- A Don Leopoldo y Doña Estela, por recibirme como un hijo;
- A Leopoldo, Teresita, Blanca y Pilar, por considerarme parte de ellos;
- A la memoria de mis abuelos Josefina, Heliadora, Pedro y Vicente, quienes habitan en mis recuerdos.

I N D I C E

	Página
RESUMEN	4
SUMMARY	5
INTRODUCCION	6
La vía metabólica de la kinurenina.....	6
El ácido quinolínico.....	12
Mecanismos de neurotoxicidad del ácido quinolínico.....	14
La sobre-excitación de los receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA).....	14
El papel del calcio intracelular en la excitotoxicidad inducida por el ácido quinolínico.....	17
El ácido quinolínico y el estrés oxidativo.....	22
El ácido quinolínico como modelo experimental de la corea de Huntington.....	25
La kinurenina y el ácido kinurénico: su papel en el antagonismo competitivo de los receptores para NMDA.....	28
El probenecid y el bloqueo del transporte activo de ácidos orgánicos.....	31
La dizocilpina como antagonista no competitivo de los receptores para NMDA.....	39
Planteamiento integrativo.....	42
HIPOTESIS	46
OBJETIVOS	47
Objetivo general.....	47
Objetivos particulares.....	47
MATERIAL Y METODO	48
Materiales.....	48
Animales.....	48
Reactivos.....	48
Métodos.....	49
Pretratamientos y microinyección estriatal de ácido quinolínico.....	49
Evaluación de la conducta de rotación.....	51
Análisis del contenido estriatal de aminoácidos.....	51
Análisis estadístico.....	54
RESULTADOS	55
Efecto de los pretratamientos con D,L-kinurenina, probenecid y dizocilpina en la conducta de rotación.....	55
Efecto de la D,L-kinurenina, el probenecid y la dizocilpina sobre la disminución estriatal de GABA inducida por el ácido quinolínico.....	58
Efecto de la D,L-kinurenina, el probenecid y la dizocilpina sobre la disminución estriatal de glutamato y aspartato inducida por el ácido quinolínico.....	61
Asociación de los efectos del probenecid y de la kinurenina sobre el contenido estriatal de GABA y la conducta de rotación.....	64
DISCUSION	68

APENDICE.....	74
Generalidades de los receptores para aminoácidos excitadores.....	74
REFERENCIAS.....	83

A B R E V I A T U R A S

QUIN	-	ácido quinolínico
KYN	-	kinurenina
KYNA	-	ácido kinurénico
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
GABA	-	ácido gamma-aminobutírico
GAD	-	glutamato descarboxilasa
GLU	-	ácido glutámico
ASP	-	ácido aspártico
APO	-	apomorfinas
MPA	-	ácido mercaptopropiónico
MK-801	-	dizocilpina
HD	-	enfermedad de Huntington
Ach	-	acetilcolina
CAT	-	colina acetil transferasa
MAO	-	monoamino oxidasa
KA	-	ácido kaínico
IBO	-	ácido iboténico
SNC	-	Sistema Nervioso Central
EAA	-	aminoácidos excitadores
AMPA	-	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolil propiónico

R E S U M E N

La kinurenina (KYN) es el metabolito precursor del ácido kinurénico (KYNA), un antagonista endógeno de los receptores glutamatérgicos para N-metil-D-aspartato (NMDA). Por su parte, el probenecid (PROB) bloquea la excreción de KYNA desde el fluido extracelular del sistema nervioso hacia la periferia. El KYNA antagoniza la acción tóxica del ácido quinolínico (QUIN), un agonista endógeno de los receptores para NMDA. En este trabajo se evaluó el efecto de la administración sistémica de PROB y KYN, por separado o en combinación, sobre la conducta de rotación y la disminución estriatal de ácido Gama-aminobutírico (GABA) y de otros aminoácidos neuroactivos como parámetros de neurotoxicidad del QUIN en el Sistema Nervioso Central. Tanto la conducta rotacional como la disminución de GABA inducidas por el QUIN fueron parcialmente prevenidas por los tratamientos con KYN (300 y 450 mg/kg) y PROB (200 y 300 mg/kg). Las dosis más bajas de estos fármacos administrados por separado no fueron efectivas para proteger contra la neurotoxicidad del QUIN; sin embargo, administradas en combinación, las dosis de 150 o 300 mg/kg de KYN + 100 mg/kg de PROB protegieron significativamente a los animales. El contenido de otros aminoácidos neuroactivos, tales como el glutamato y el aspartato, disminuidos por la acción tóxica del QUIN, fueron parcialmente recuperados por los pretratamientos con KYN, PROB y KYN + PROB. Estos hallazgos sugieren un papel determinante de la KYN y del PROB como promotores del antagonismo sobre los receptores para NMDA mediado por el KYNA.

S U M M A R Y

Kynurenine (KYN) is the precursor metabolite of kynurenic acid (KYNA), an endogenous antagonist of the NMDA (N-methyl-D-aspartate) subtype of glutamatergic receptor. On the other hand, probenecid (PROB) is able to block the excretion of KYNA from the extracellular fluid of the nervous system. KYNA antagonizes the toxic action of quinolinic acid (QUIN), an NMDA receptor endogenous agonist. Therefore, in this work, we tested the effect of systemic administration of PROB and KYN, either alone or in combination, both on QUIN-induced circling behavior and gamma-aminobutyric acid (GABA) and other neuroactive amino acids' depletion. Circling behavior and GABA depletion were both partially prevented by KYN (300 and 450 mg/kg) and PROB (200 and 300 mg/kg) treatments. Lower doses of these drugs administered separately were non-protective. However, when administered in combination, doses of KYN (150 or 300 mg/kg) + PROB (100 mg/kg) significantly protected animals against QUIN neurotoxicity. Levels of other neuroactive amino acids, such as glutamate and aspartate, depleted by QUIN, were partially recovered by KYN, PROB and KYN + PROB pretreatments. These findings suggest a role of KYN and PROB as promoters of KYNA-mediated NMDA receptor antagonism.

I N T R O D U C C I O N

La vía metabólica de la kinurenina

Fue en 1947 que la vía de la kinurenina fue reconocida como una ruta importante en la conversión de triptofano a nicotinamida y sus nucleótidos conjugados (Beadle et al, 1947). El interés en la vía de la kinurenina se centró en su importancia como fuente de nicotinamida y como una vía alterada en casos de deficiencia de piridoxina, siendo esta vitamina un cofactor esencial para muchas enzimas en la vía mencionada (Stone, 1993).

La vía metabólica de la kinurenina ha sido descrita tanto en hígado y cerebro de humanos, como en primates no humanos, roedores y otros mamíferos menores (Vender, 1975; Wolfensberger et al., 1984; Moroni et al., 1984a).

En tejidos periféricos, fundamentalmente en el hígado, el anillo indólico del L-triptofano es oxidativamente abierto por la enzima triptofano-2,3-dioxigenasa (TDO), algunas veces referida como triptofano pirrolasa. La enzima, la cual es hemo-dependiente, tiene una vida media de aproximadamente 2 horas en los mamíferos y su actividad es rápidamente modificada por la disponibilidad de sustrato (Bender, 1989). La administración de triptofano o compuestos relacionados, tales como el alfa-metil triptofano, induce fuertemente la actividad de la TDO por un mecanismo aparentemente no dependiente de la síntesis proteica o de RNA, a un nivel al cual gran parte del triptofano periférico es metabolizado por ruptura de su estructura y una pequeña

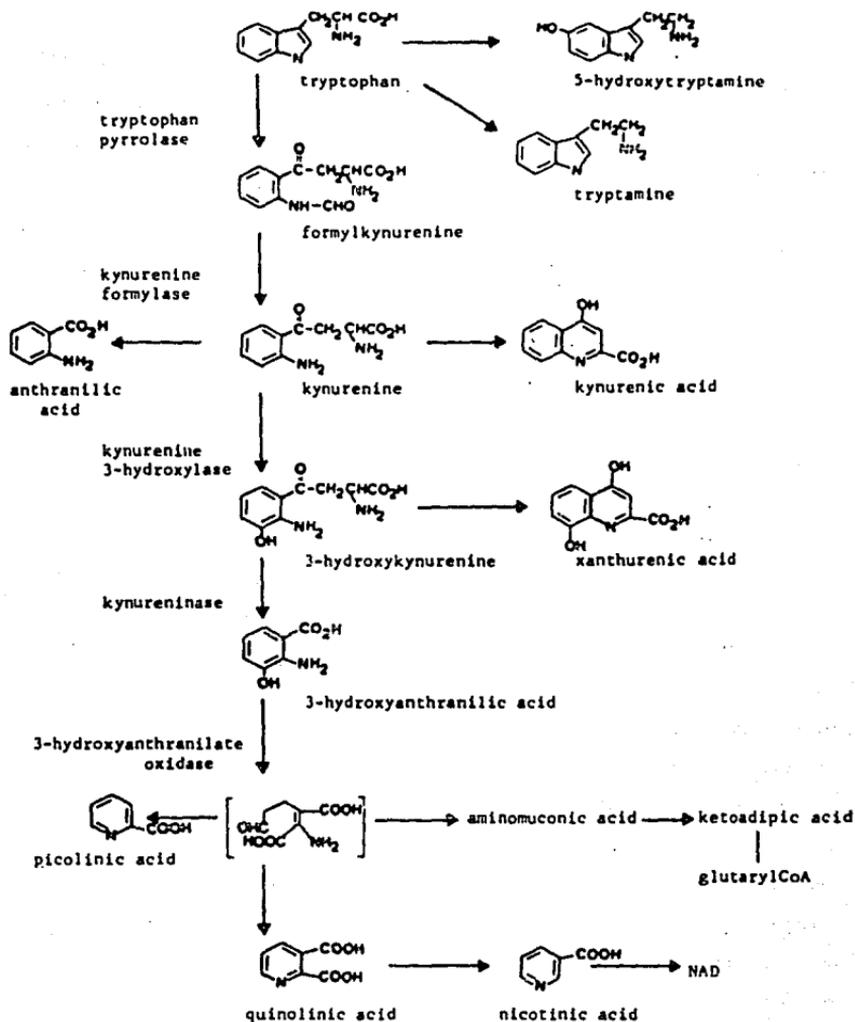


Fig. 1. La vía de la kinurenina del metabolismo del triptofano. Tomado de Bruyn R.P.M. and Stoof J.C. (1990): The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.*, 95: 29-38.

porción está disponible para su penetración al sistema nervioso y su subsecuente metabolismo hacia la serotonina o las kinureninas (Sourkes, 1971). La consecuencia de dichos procesos es una profunda disminución de los derivados indol del triptofano en el sistema nervioso.

La actividad de la TDO puede también ser inducida por glucocorticoides en un mecanismo que involucra la inducción de la síntesis de RNAm y de proteínas (Salter and Pogson, 1985).

Debido a que la TDO es activa sólo sobre el metabolismo del L-triptofano, la administración sistémica de este aminoácido resulta en la producción de L-kinurenina por vía de la L-formil-kinurenina (Higuchi and Hayaishi, 1967). La enzima responsable de esto es también hemo-dependiente: la indoleamina dioxigenasa (IDO). Esta enzima también depende de superóxido, y su actividad es regulada por la presencia de sistemas generadores de radicales libres, tales como el ascorbato, el azul de metileno o la xantina/xantina oxidasa, pudiendo ser inhibida por la superóxido dismutasa (Hirata and Hayaishi, 1971). La IDO es también activa para metabolizar el L- y el L-5-hidroxitriptofano, la triptamina, la 5HT y la melatonina (Hirata and Hayaishi, 1971). Mientras que la TDO está presente en el hígado, la IDO está ausente del mismo, pero presenta una amplia distribución en los tejidos intestinales, la placenta y particularmente en el cerebro de los mamíferos. Especialmente en el cerebro de la rata, la enzima muestra una gran actividad en el hipotálamo (Gal and Sherman, 1980).

Por su parte, la kinureninasa se presenta en grandes concentraciones en el cerebro de la rata y de humanos. Debido a que la actividad de la kinurenina hidroxilasa es reducida en el sistema nervioso central, surgen algunos cuestionamientos acerca de la habilidad del cerebro de metabolizar sus propias kinureninas a lo largo de esta vía, hasta el punto de la formación de 3-hidroxicinurenina y de ácido 3-hidroxi-antranílico. Ahora se sabe que la kinureninasa es también capaz de hidrolizar la L-kinurenina para formar ácido antranílico (Bender and McCreanor, 1982), que a su vez puede inducir hidroxilación sobre los ácidos 3- ó 5-hidroxi-antranílicos, lo cual explica la habilidad del cerebro para formar ácido 3-hidroxi-antranílico directamente a partir de ácido antranílico (Baran and Schwarcz, 1990), que a su vez puede entrar con facilidad al cerebro, constituyendo una alternativa para la activación de la vía, siendo este proceso independiente de la presencia de triptofano.

La vía de la kinurenina puede ser manipulada farmacológicamente por la nicotinilalanina, un análogo de la L-kinurenina capaz de elevar el contenido cerebral de ácido kinurénico, a expensas de la disminución de ácido quinolínico (Connick et al., 1992). Más aún, en ratones con elevadas concentraciones cerebrales de ácido kinurénico, la nicotinilalanina muestra un efecto protector, suprimiendo las convulsiones inducidas por electroshocks (Connick et al., 1992), y constituyendo así, una alternativa más en el empleo de análogos de los metabolitos de esta vía, con un importante potencial

terapéutico.

Por otra parte, la conversión de la L-kinurenina a kinurenato ocurre por una transaminación irreversible catalizada por una enzima que se encuentra en la fracción mitocondrial astrocítica del cerebro de los mamíferos: la L-kinurenina aminotransferasa (Vezzani et al., 1991), sugiriendo que la vía de la kinurenina se lleva a cabo preferencialmente en la glía, y no en las neuronas, lo que ha permitido postular que la secreción del kinurenato ocurre desde las células gliales que están en inmediata vecindad, hacia ciertos contactos sinápticos específicos, en el espacio extracelular (Stone, 1993). Cabe señalar que ésta es una enzima altamente selectiva por su sustrato (la L-kinurenina), en comparación con su baja afinidad por el triptofano, el glutamato y el aminoácido, los cuales compiten pobremente por la enzima (Turski et al., 1989).

La conversión de 3-hidroxiantranilato a ácido quinolínico está regulada por la enzima hepática 3-hidroxiantranilato oxigenasa (3-HAO), la cual también se ha identificado en el cerebro de mamíferos, en la fracción citoplásmica soluble. La 3-HAO involucra la producción inicial de semialdehído aminocarboximucónico, el cual entra en un ciclo no enzimático generador del ácido quinolínico (Long et al., 1954). Otra enzima, comúnmente llamada picolínico carboxilasa, descarboxila este intermediario a semialdehído aminomucónico, conduciendo a la formación cíclica inicial de ácido picolínico, y posteriormente, al ácido quinolínico. La secuencia de eventos generadores del

ácido quinolínico en el sistema nervioso central parece ocurrir cuando la 3-HAO es expuesta a bajas concentraciones de su sustrato (Cook and Pogson, 1983). Un desbalance en la actividad de esta enzima conduce a un incremento intracerebral de ácido quinolínico, resultando en procesos excitotóxicos tendientes a la degeneración neuronal (Stone, 1993). También se sabe que un desbalance en las proporciones cerebrales entre el ácido kinurénico y el quinolínico (KYNA:QUIN) tendiente a la disminución del primero, representa un factor potencialmente patógeno involucrado en múltiples neuropatías (Stone, 1993). La habilidad de la 3-HAO para incrementar las concentraciones cerebrales de QUIN confirma que esta enzima no parece ser la enzima típicamente limitante de la tasa metabólica de la vía de la kinurenina.

La ácido quinolínico fosforribosiltransferasa (QPRT) es la última enzima en importancia de esta vía y cataliza la condensación del QUIN y del fosforribosil-pirofosfato, así como la descarboxilación del conjugado intermediario para formar ácido nicotínico mononucleótido. También presente en el hígado y el cerebro de mamíferos (Okuno and Schwarcz, 1985), la QPRT puede ser inhibida por los análogos del quinolinato (Kalikin and Calvo, 1988). Existe, sin embargo, una falta de correspondencia entre las células gliales que contienen a la enzima de síntesis del QUIN, la 3-HAO, y las que contienen a su enzima de degradación, la QPRT. Esto sugiere que el QUIN debe ser catabolizado en aquellas células que no son responsables de su síntesis, y que, consecuentemente, le permitan al QUIN ingresar al espacio

extracelular en su migración entre ambas enzimas (Stone, 1993). La localización de la QPRT en células gliales, fundamentalmente en astrocitos, ha sido demostrada en el cerebro de diversas especies de mamíferos (Du et al., 1991).

La farmacología de las enzimas metabolizantes de las kinureninas no ha sido estudiada a profundidad, pero se sabe que muchas de éstas son afectadas por un gran número de antibióticos, anti-esquistosomales y psicotrónicos, así como por estrógenos (Mostafa et al., 1982; El-Sewedy, 1989).

El ácido quinolínico

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico, QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptófano que se forma en la vía de la kinurenina (Vender, 1975), mostrando actividad como agonista endógeno de los receptores glutamatérgicos para NMDA (Stone, 1993).

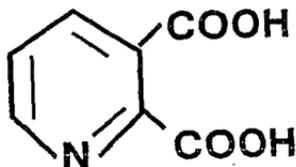


Figura 2. Estructura química del ácido quinolínico.

El QUIN fue identificado por primera vez en tejido cerebral de la rata y de humanos (Wolfensberger et al., 1984), y está distribuido preferencialmente en corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral de múltiples especies de mamíferos. Se sabe que su concentración se

incrementa con la edad, de manera que en animales "seniles", las concentraciones cerebrales de dicha toxina pueden ser muy elevadas (Moroni et al., 1984b). Esta peculiaridad tiene gran importancia pues indica que el QUIN podría estar vinculado a los procesos de envejecimiento celular, constituyendo un factor potencialmente activo en la degeneración y muerte neuronal programada, también conocida como apoptosis (Stone, 1993).

Por espectrometría de masas, se ha demostrado que el contenido basal de este metabolito en el sistema nervioso de la rata es de aproximadamente 12 pmol/mg de proteína o 2.1 nmol/g de tejido (Lombardi, 1983). Estos datos representan a su vez, una concentración cerebral total de aproximadamente 2 μ M, con valores especialmente altos en corteza cerebral (2.1 nmol/kg) y valores particularmente bajos en el cuerpo estriado (0.6 nmol/g). En vista de la disparidad de la localización de las enzimas de síntesis (3-HAO) y de degradación (QPRT) del QUIN, se cree que su posible papel fisiológico pudiera estar relacionado con su actividad como neurotransmisor o neuromodulador en el sistema nervioso central (Stone, 1993). Su capacidad para cruzar efectivamente la barrera hematoencefálica es muy reducida, por lo se presume que su contenido en el cerebro se origina a partir del funcionamiento de la vía de la kinurenina específica del sistema nervioso (Foster et al., 1984).

El cuerpo estriado parece no tener mecanismos de remoción rápida ni de degradación del QUIN en el espacio extracelular, por no tener proporciones significativas de la QPRT o de otras enzimas de degradación de este metabolito (Stone, 1993), lo cual

puede explicar la selectividad de los efectos tóxicos del QUIN sobre esta región cerebral.

Mecanismos de neurotoxicidad del ácido quinolínic

Los procesos tóxicos por los cuales el ácido quinolínic ejerce sus efectos en el sistema nervioso central, alterando bioquímica y morfológicamente su funcionamiento, serán discutidos a continuación:

La sobre-excitación de los receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA). El primer modelo de toxicidad propuesto para explicar los efectos nocivos del ácido quinolínic en el cerebro, representa, de manera muy elemental, la acción de este agonista tipo NMDA a nivel de las sinapsis glutamatérgicas (Schwarcz et al., 1984). Sin embargo, las alteraciones inducidas por la administración intraestriatal de esta neurotoxina a ratas y a primates no humanos, ya no ha seguido siendo considerada desde este punto de vista reduccionista, como podrá observarse posteriormente. A partir de dicho modelo, el concepto de "excitotoxicidad", referente a la alteración de los procesos convencionales de transmisión sináptica excitatoria por la sobre-excitación de los receptores involucrados, tomó gran importancia. Según este modelo, el QUIN puede actuar de dos formas: ya sea activando receptores presinápticos específicos para NMDA o para el mismo QUIN, induciendo así la liberación, por excitación, de un posible neurotransmisor endógeno, el cual, a su vez, puede unirse a un receptor postsináptico glutamatérgico de tipo NMDA; o

Aún hoy, algunas de las hipótesis postuladas por este modelo tienen vigencia. Por ejemplo, se sabe que el resultado final de la presencia prolongada de agentes excitadores en el espacio sináptico es la excesiva activación de las neuronas, las cuales son, desde un punto de vista simplista, "excitadas hasta la muerte". Los mecanismos iónicos de excitación involucrados en tales procesos apuntan a que los canales permeables a sodio y calcio asociados a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA juegan un papel determinante en la serie de eventos que conducirán a la muerte celular (Bruyn and Stoof, 1990).

Elevadas concentraciones de calcio intracelular están relacionadas con daño neuronal y con procesos de degeneración celular (Bondy, 1989), por lo que su participación en el mecanismo de toxicidad del QUIN es muy relevante y requiere ser analizado por separado.

A partir de reportes más recientes sobre el papel del QUIN como agonista específico de los receptores para NMDA y sus efectos en el sistema nervioso central, así como de la arquitectura funcional y las propiedades de dichos receptores, el modelo original de toxicidad del QUIN propuesto por Schwarcz et al. (1984), se ha modificado sustancialmente.

Hoy se sabe que el QUIN es capaz de activar receptores pre y postsinápticos tipo NMDA e inducir, por sí mismo, o por su efecto sobre la liberación de glutamato desde la terminal presináptica, la excesiva activación de dichos receptores. Más aún, la existencia de dos subpoblaciones bien caracterizadas de receptores para NMDA en el sistema nervioso central de los

mamíferos: NMDA-1 (predominantes en médula espinal y cerebelo, activados preferencialmente por NMDA y no tanto por QUIN) y NMDA-2 (más densamente distribuidos en cuerpo estriado, hipocampo y corteza cerebral, más susceptibles a la activación por QUIN y no tanto por NMDA); descarta temporalmente la existencia de receptores específicos para el QUIN y su consecuente postulación como neurotransmisor endógeno (Stone, 1993), dando una nueva y más precisa perspectiva al modelo.

El papel del QUIN como agonista de los receptores a NMDA y sus efectos tóxicos en el sistema nervioso central, representa una herramienta experimental de gran valor para el estudio de las alteraciones conductuales, morfológicas y bioquímicas de las enfermedades neurodegenerativas que involucran la activación prolongada de receptores para aminoácidos excitadores (EAA).

El papel del calcio intracelular en la excitotoxicidad inducida por el ácido quinolinico. Los mecanismos de transducción regulados por los receptores para EAA involucran la apertura de canales iónicos: los canales asociados a los receptores para NMDA, AMPA y kainato son permeables para sodio y potasio, pero sólo los NMDA son permeables también a Ca^{2+} . (Stone, 1993).

Existen evidencias de que la acción de los EAA en el sistema nervioso guarda una relación más estrecha con la actividad de la fosfolipasa C, que con la adenilato ciclasa. También se tiene evidencia de que la activación de ciertos receptores para EAA, estimula la vía de segundos mensajeros de inositol fosfato/diacilglicerol (Bruyn and Stoof, 1990).

Dos explicaciones alternativas han sido propuestas para los mecanismos tóxicos vinculados con la sobre-excitación de los receptores para NMDA, mediados ambos por la permeabilidad a diferentes iones:

a) La prolongada despolarización de las células nerviosas inducida por EAA permite, por cambios en la permeabilidad a iones, el ingreso de cloruros al citosol celular, modificando así el gradiente electroquímico. La entrada de cloruros, a su vez, resulta en el ingreso casi simultáneo de cationes mono y divalentes (Na^+ y Ca^{2+}), con la finalidad de mantener la electroneutralidad, seguida por una entrada de moléculas de agua, las cuales conducen eventualmente a una citólisis hipertónica (Rothman and Olney, 1987).

b) El mecanismo implicado en la activación de receptores a NMDA más aceptado hasta ahora consiste en la entrada masiva de iones Ca^{2+} y Na^+ al interior celular por la apertura de sus canales asociados permeables a cationes. La concentración normal de calcio en el citosol es de aproximadamente 100 nM, mientras que en el espacio extracelular es 10,000 veces mayor. El incremento sostenido en la concentración citosólica de calcio tiene severas repercusiones en los procesos fisiológicos: activación de proteasas, lipasas y fosfatasas, generación de radicales libres y alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Cheung et al., 1986; Choi, 1988).

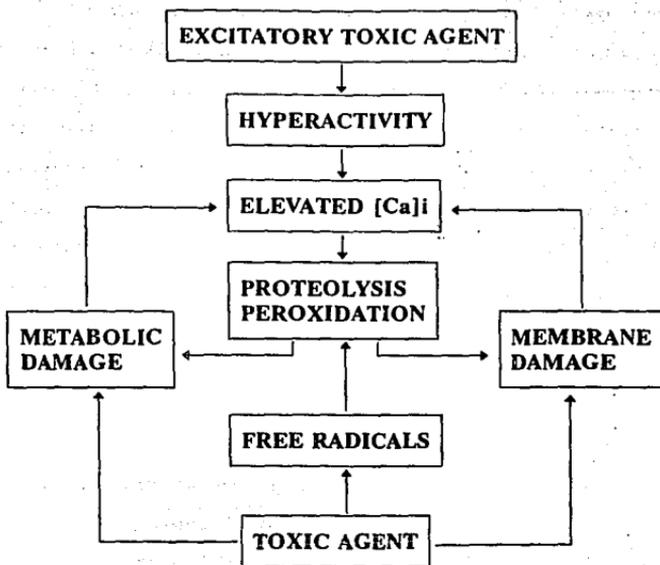


Figura 4. Mecanismos propuestos por los cuales elevadas concentraciones de calcio intracelular pueden inducir y exacerbar varias formas de daño neurotóxico. Tomado de Bondy C.S. (1989): Intracellular calcium and neurotoxic events. *Neurotoxicol. Teratol.*, 11: 527-531.

El calcio es un segundo mensajero involucrado en una amplia gama de procesos metabólicos celulares. Muchas clases de proteínas (incluyendo las 3'5'-AMPc proteínas) regulan su actividad por calcio (Bondy, 1989).

Existen dos mecanismos básicos mediante los cuales la concentración intracelular de calcio puede ser incrementada

(Bondy, 1989):

1) El calcio extracelular puede ingresar a la célula a través de la membrana plasmática, por canales de calcio específicos o por acarreadores del ión. Un gran número de canales de calcio han sido caracterizados farmacológicamente en el Sistema Nervioso. La entrada de calcio puede además deberse a daño inespecífico en la membrana neuronal, dado que la integridad de dicha membrana es vital para mantener los gradientes de calcio extra e intracelulares. Bajo circunstancias normales, la permeabilidad pasiva de la membrana al Ca^{2+} es cuatro veces menor en magnitud a la de Na^+ o K^+ .

2) Otra forma de incrementar los niveles intracelulares de calcio es por su liberación desde reservorios internos, tales como la mitocondria o el retículo endoplásmico (Bondy, 1989), mediante mecanismos que involucran la activación de receptores al inositol trifosfato (IP_3). Menos del 1 % del calcio intracelular se encuentra en forma libre. El 99 % restante se encuentra almacenado en membranas subcelulares y organelos, unido a proteínas (Bondy, 1989).

Elevadas concentraciones de calcio intracelular han sido correlacionadas con daño neuronal presumiblemente inducido por el rompimiento generalizado de la integridad celular o por la disminución de los procesos energéticos celulares (Bondy, 1989). El incremento en calcio intracelular inducido por excitotoxinas, como el QUIN, puede ser acompañado de eventos tóxicos en el sistema nervioso (por ejemplo, convulsiones), sin ser necesariamente ésta la causa de la muerte celular (Vezzani et

al., 1988).

Muchas rutas metabólicas pueden ser exacerbadas por el calcio intracelular en altas concentraciones. La activación excesiva de proteasas produce la degradación de proteínas; las lipasas, por su parte, incrementarán las proporciones de lípidos libres en respuesta a estrés oxidativo, además de alterar los procesos de transporte axoplásmico (Vezzani et al., 1988). El calcio también puede potenciar el daño oxidativo celular, y de manera inversa, varios agentes pro-oxidantes parecen incrementar los niveles de calcio citosólico (Halliwell and Gutteridge, 1985). Los bloqueadores de canales de calcio, tales como el magnesio, el cadmio, y el verapamil, pueden prevenir la toxicidad de este ión. En presencia de agentes neurotóxicos y de organometales, la concentración de calcio citosólico aumenta drásticamente, pero no así la de ATP, sugiriendo que el sistema productor de ATP puede estar deprimido (Komulainen and Bondy, 1987).

Algunos de estos eventos tóxicos caracterizados para el calcio, han sido comprobados en presencia del QUIN en el sistema nervioso (Bruyn and Stoff, 1990).

Finalmente, el calcio intracelular elevado es responsable de la activación de nucleasas que conducen a la formación de productos de oxidación membranal de los grupos sulfhidrilo (-SH), y también, al daño irreversible al DNA (Gutteridge and Halliwell, 1990).

El ácido quinolinico y el estrés oxidativo. Un descubrimiento de gran interés en el estudio de los mecanismos de toxicidad del QUIN en el sistema nervioso central, hace referencia a la potencia pro-oxidante de esta neurotoxina, evaluada en estudios *in vitro* (Ríos and Santamaría, 1991) e *in vivo* (Santamaría and Ríos, 1993). En ambos reportes, se examinó la habilidad del QUIN para formar productos derivados del ácido tiobarbitúrico, así como productos lipídicos fluorescentes, ambos como índices del grado de peroxidación de lípidos analizados tanto en homogenados de cerebro completo de rata, como en tejido estriatal.

La peroxidación de lípidos es un proceso citotóxico que ocurre como resultado de la acción nociva de los radicales libres (especies moleculares altamente reactivas) sobre los lípidos insaturados de la membrana, alterando la conformación y la funcionalidad de las membranas lipídicas de las neuronas (Halliwell and Gutteridge, 1985).

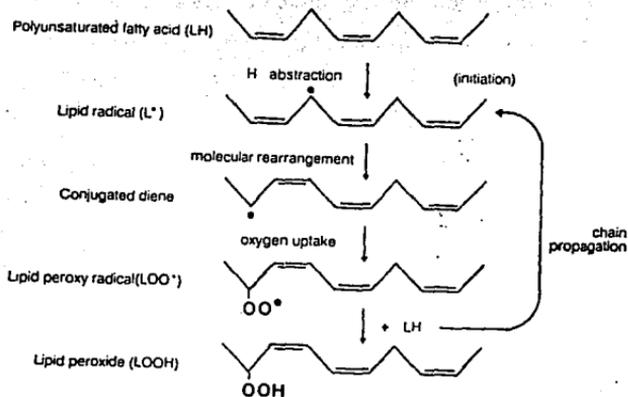


Figura 5. Iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos. Tomado de Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1985): *Free radicals in biology and medicine*. Claredon Press, Oxford.

En el primer reporte, el quinolinato, a concentraciones de tan sólo 20 a 80 μM , fue capaz de incrementar de manera concentración-dependiente, la lipoperoxidación en comparación con valores control. Esta tendencia se observó también en los estudios *in vivo*, en los cuales la peroxidación de lípidos fue incrementada de manera dosis- y tiempo-dependiente después de la administración intraestriatal a las ratas, de dosis nanomolares de QUIN (120 a 480 $\text{nmol}/\mu\text{l}$), mismas que han sido empleadas en otros estudios para reproducir los perfiles patológicos del modelo de corea de Huntington (Beal, et al., 1986). Debido a que

la peroxidación lipídica está íntimamente relacionada con la formación de radicales libres y, en consecuencia, con daño celular, estas evidencias sugieren que la toxicidad del ácido quinolínico puede estar mediada, al menos parcialmente, por la vía del estrés oxidativo. Más aún, las observaciones más interesantes derivadas de estos estudios, radican en la prevención del efecto pro-oxidativo mediado por el QUIN en presencia de antagonistas tipo NMDA (kinurenato, para los experimentos *in vitro*, y MK-801, para los experimentos *in vivo*), sugiriendo la posibilidad de que dichas alteraciones sean mediadas directamente por estos receptores. Otro aspecto sobresaliente fue la evidencia mostrada acerca de los efectos preventivos de la administración de la L-kinurenina sobre la lipoperoxidación inducida por el QUIN *in vitro*, indicando que este precursor metabólico del ácido kinurénico (KYNA), pudo haber actuado por un mecanismo de producción de KYNA, incrementando así las concentraciones cerebrales de dicho antagonista, y modulando el estrés redox inducido por la excesiva excitación de los receptores para NMDA. De gran interés, en los próximos años, será la caracterización detallada del papel que juega el QUIN como activador de este proceso citotóxico, así como el estudio del efecto de otros antagonistas tipo NMDA más selectivos sobre el estrés redox basal y sobre el inducido por el QUIN.

El ácido quinolínico como modelo experimental de la corea de Huntington

La corea de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa de origen hereditario que se caracteriza por la destrucción neuronal selectiva, gradual e irreversible de grupos celulares específicos (neuronas GABAérgicas y colinérgicas espinosas) del cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza cerebral. A nivel molecular, se observa una disminución en el contenido estriatal de GABA y Ach, mientras que a nivel morfológico e histológico, son evidentes la degeneración somática neuronal, la necrosis de las áreas afectadas y la proliferación glial (Shoulson, 1984).

Dentro de las manifestaciones más importantes de esta enfermedad progresiva y mortal, destacan los movimientos coreiformes (tipo danza) involuntarios de las extremidades, las gesticulaciones, la demencia, la disfagia (incapacidad para deglutir) y la disartria (incapacidad en la articulación de movimientos), evolucionando hasta la inevitable muerte del paciente, en un período que puede tomar entre 5 y 15 años (Shoulson, 1984).

En la década pasada (Beal et al., 1986), se realizó uno de los primeros estudios tendientes a caracterizar los efectos del QUIN sobre los perfiles bioquímicos de daño al sistema nervioso central en la rata (por análisis inmunohistoquímicos), en la búsqueda de un posible modelo experimental de la corea de Huntington. En este estudio comparativo, se emplearon múltiples sustancias excitadoras, y sus efectos tóxicos, a nivel del cuerpo

estriado de la rata, fueron evaluados (específicamente, las alteraciones morfológicas neuronales, así como los perfiles bioquímicos de algunas sustancias neuroactivas). La inmunorreactividad a somatostatina, neuropéptido Y, sustancia P, vasopresina, GABA y acetilcolina, fue evaluada después de la administración *in vitro* de ácido ptálico, ácido nicotínico, NMDA, ácido iboténico, kainato y QUIN (Beal et al., 1986). En relación a los parámetros estudiados, no se encontraron cambios significativos en los tratamientos con ácido ptálico ni con ácido nicotínico. Sin embargo, el resto de los agentes empleados redujeron significativamente la inmunorreactividad a la sustancia P, a la Ach y al GABA estriatal, tal como ocurre en la corea de Huntington (Shoulson, 1984). A diferencia de los otros agentes, el QUIN no alteró la inmunorreactividad a la somatostatina ni al neuropéptido Y, constituyendo, en comparación con los otros agentes excitadores, un patrón de toxicidad más selectivo y reproducible para esta enfermedad. La necrosis y la degeneración celular características de la corea de Huntington también han sido reproducidas con precisión por el QUIN. A partir de estudios como este, los efectos tóxicos del QUIN han sido caracterizados con mayor profundidad, conduciendo a la postulación de esta neurotoxina como el mejor modelo para reproducir las características bioquímicas, histopatológicas y conductuales de esta enfermedad (Schwarcz et al., 1984; Sanberg et al., 1989; Bruyn and Stoof, 1990; Hantraye et al., 1990; Block et al., 1993). Los efectos que le han conferido al QUIN esta consideración son obtenidos cuando este metabolito del triptofano

es administrado *in vivo* en el cuerpo estriado de la rata y de primates no humanos. Dichos efectos son: la disminución estriatal de GABA y Ach, así como la disminución de la actividad de sus respectivas enzimas sintéticas, la GAD y la CAT, las anomalías en la locomoción de los animales lesionados con el QUIN y la destrucción selectiva de neuronas GABAérgicas y colinérgicas estriatales dando, en conjunto, un patrón de gran similitud al de las alteraciones observadas en la corea de Huntington (Bruyn y Stoof, 1990).

TABLA I. PERFILES NEUROQUIMICOS EN EL CUERPO ESTRIADO DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD) Y DE RATAS LESIONADAS CON KAINATO, IBOTENATO (KA/IBO) O QUINOLINATO (QUIN).

Molécula Neuroactiva	HD	KA/IBO	QUIN
GABA/GAD	↓	↓	↓
Acetilcolina/ChAT	↓	↓	↓
Sustancia P	↓	↓	↓
Dopamina	s.c.	s.c.	s.c.
Vasopresina	s.c.	s.c.	s.c.
Somatostatina	↑	↓	s.c.
Neuropéptido Y	↑	↓	↓

↓ = Disminuye, ↑ = Aumenta, s.c. = Sin Cambio

Basado en la recopilación de Bruyn R.P.M. and Stoof J.C. (1990): The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.*, 95: 29-38.

Más recientemente, tanto el QUIN como la vía metabólica de la kinurenina, han sido implicados en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas (Moroni et al., 1986; Schwarcz et al., 1988; Stone and Connick, 1985), infecciosas e inflamatorias (Heyes et al., 1990; Heyes and Lackner, 1990; Heyes et al., 1992; Ogawa et al., 1992), confiriéndole a esta neurotoxina una dimensión inmunopatológica. En tanto su papel en dichas

enfermedades es elucidado, los reportes concernientes a sus patrones de toxicidad y a su empleo como modelo experimental de la enfermedad de Huntington en ratas y primates no humanos aún continúan (Schwarcz et al., 1983; Beal et al., 1986; Hantraye et al., 1990; Ferrante et al., 1993).

La kinurenina y el ácido kinurénico: su papel en el antagonismo competitivo de los receptores para NMDA

La kinurenina (KYN) es el primer metabolito formado a partir del L-triptofano en la vía metabólica que recibe el mismo nombre. A su vez, la KYN representa el precursor inmediato del ácido kinurénico en la vía que lleva su nombre. Por su parte, el ácido kinurénico (KYNA) fue una de las primeras kinureninas reportadas en diferentes órganos y tejidos de mamíferos (Ellinger, 1904). La confirmación de la presencia de ácido kinurénico en el cerebro de la rata es relativamente reciente (Carlà et al., 1988; Moroni et al., 1988) y su contenido basal fue cercano a los 24 pmol/g. Por regiones, tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo, la concentración total reportada de KYNA fue de 15 pmol/g. Otras especies, el ratón, el conejo y el hombre, exhiben concentraciones cerebrales de KYNA que van desde los 5 (en ratón) hasta los 150 pmol/g (en humano) (Stone, 1993).

Como metabolito endógeno del triptofano, el KYNA se forma en la vía de la kinurenina, siendo generado a partir de la transaminación irreversible de la KYN (Vender, 1975). En consecuencia, la progresiva elevación de la concentración de KYNA en el sistema nervioso, debe adjudicarse a la actividad de la

enzima kinurenina aminotransferasa (Gramsbergen et al., 1992).

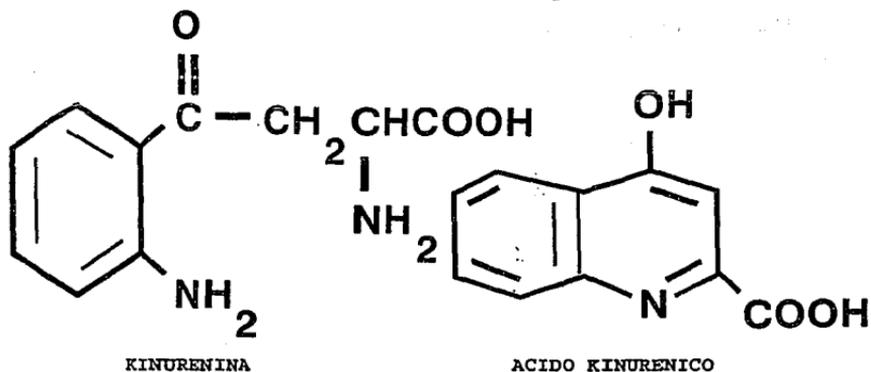


Figura 6. Estructura química de la kinurenina y del ácido kinurénico.

La importancia biológica de los procesos metabólicos que involucran la formación de KYN a partir del triptofano, y la consecuente generación de KYNA a partir de KYN, debe relacionarse directamente con la potencia antagonista del KYNA sobre los receptores para NMDA (Stone, 1993). El KYNA es capaz de bloquear la función de los receptores para NMDA mediante un proceso de antagonismo competitivo que involucra la ocupación del sitio alostérico de la glicina en dicho receptor (Russi et al., 1989; Russi et al., 1992). Este proceso ha resultado efectivo en la prevención de la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico, tanto *in vitro*, como *in vivo*, en el sistema nervioso central de la rata (Foster et al., 1984; Lekieffre, et al., 1990).

Adicionalmente, se ha demostrado que la administración sistémica de L-kinurenina a animales de experimentación, representa una herramienta farmacológica adecuada para incrementar el contenido plasmático y cerebral de KYNA, en una concentración final hasta 40 veces mayor que la basal (Vécsei et al., 1992a; Vécsei et al., 1992b). Estos cambios resultan directamente en el incremento en las concentraciones micromolares de KYNA en los espacios extracelulares, que son suficientemente grandes para ocupar el sitio de la glicina en el receptor NMDA, para el cual la CE_{50} del KYNA es de aproximadamente 15 μ M (Danysz et al., 1989).

Por este medio, las elevadas concentraciones de KYNA en el cerebro se han empleado para prevenir las convulsiones inducidas tanto por pentilentetrazol como por NMDLA (2 potentes agentes convulsivantes) en ratones (Vécsei et al., 1992b).

En la búsqueda de alternativas potencialmente terapéuticas contra las alteraciones producidas por EAA en el Sistema Nervioso Central (SNC), un aspecto a considerar para el empleo de la estrategia antes mencionada tiene que ver con la limitada habilidad del KYNA para atravesar la barrera hemato-encefálica (BHE), y llegar así al sistema nervioso central (Swartz et al., 1990; Fukui et al., 1991). Por su parte, la kinurenina (KYN) puede cruzar efectivamente la BHE, incrementando, de manera dosis-dependiente, las concentraciones cerebrales de KYNA (Miller et al., 1992). Se ha demostrado recientemente que la administración intracerebroventricular de KYNA, pero no de KYN, resulta en ataxia y conducta estereotipada en la rata (Vécsei and

Beal, 1990), apoyando, aún más, la estrategia que involucra la manipulación farmacológica de la vía de la kinurenina, orientada a incrementar los niveles cerebrales de KYNA por la inducción de su síntesis, y no por su administración directa.

Los estudios sobre las cualidades antagónicas del KYNA, su efecto protector sobre las alteraciones inducidas por EAA en el SNC y el papel de la vía de la kinurenina en estos eventos aún continúan, y tienen como finalidad principal caracterizar la estructura y la función de los receptores para EAA. Los hallazgos que de estos estudios se desprendan en el futuro, tendrán gran relevancia en la planeación y el desarrollo de alternativas terapéuticas que involucren la sobre-excitación de los receptores para NMDA (Stone, 1993).

El probenecid y el bloqueo del transporte activo de ácidos orgánicos

Los agentes uricosúricos actúan directamente sobre el túbulo renal para incrementar la tasa de excreción del ácido úrico. Aun cuando muchos agentes comparten esta propiedad, realmente pocos (fundamentalmente el probenecid y la sulfipirazona) son usados clínicamente como agentes uricosúricos. En el uso clínico de los fármacos uricosúricos, debe considerarse su capacidad de alterar la unión plasmática, la distribución y la excreción de otros ácidos orgánicos endógenos y de sus derivados (Weiner, 1990).

El probenecid fue descubierto como resultado de una estrategia bien planeada para cumplir un objetivo específico: la

fueron de poco significado práctico en sus inicios, por lo que había que optimizar su permanencia sistémica. Por esta razón, Beyer y asociados emprendieron un estudio dirigido a encontrar un ácido orgánico que pudiera deprimir la secreción tubular de la penicilina, modificando su tasa de filtración glomerular, la extensión de su unión a proteínas plasmáticas, su tasa de flujo urinario o la actividad de sus mecanismos de transporte tubular (todos ellos procesos fisiológicos de la excreción de compuestos orgánicos). El primer compuesto evaluado clínicamente para estos propósitos fue la carinamida, la cual requería ser administrada frecuentemente para tener efecto. Este problema fue solucionado años después con el descubrimiento del probenecid (Beyer et al., 1951).

El probenecid (PROB) es un derivado del ácido benzóico altamente soluble en lípidos (pK_a 3.4). Múltiples congéneres del PROB han sido estudiados. El incremento del tamaño de la sustitución del N-alquilo resulta en compuestos más eficientes. La actividad óptima aparece en el PROB, el derivado N-dipropil. En 1966, Gutman reportó la relación estructura-actividad en los congéneres del PROB y en otras drogas uricosúricas.

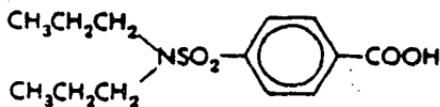


Figura 7. Estructura química del Probenecid.

Las acciones farmacológicas del PROB permanecen confinadas a la inhibición del transporte de ácidos orgánicos a través de las barreras epiteliales. Esta acción es más importante en el túbulo renal, en el cual se inhibe la secreción tubular de múltiples fármacos y de sus metabolitos (Weiner et al., 1964; Diamond, 1978). La acción renal del PROB reduce las concentraciones de ciertos compuestos en la orina y en el plasma, en lo que se considera un efecto terapéutico muy deseable para el caso de la penicilina y antibióticos relacionados que tienen una acción sistémica benéfica, pero constituye un efecto indeseable con agentes tales como la nitrofurantoina, cuando se emplea como antiséptico urinario. Cuando la secreción tubular de una sustancia es inhibida, su concentración final en la orina está determinada por el grado de filtración (el cual corresponde a una función de su unión a proteínas plasmáticas) y de reabsorción (Weiner, 1990). El significado de cada uno de estos factores varía ampliamente con cada compuesto empleado.

El ácido úrico es uno de los compuestos endógenos más importantes de los cuales se sabe que su excreción puede ser incrementada por el PROB, mediante la inhibición de su reabsorción. La acción uricosúrica del PROB es mitigada por la administración de salicilatos (Weiner, 1990).

El uso del PROB (a una dosis total diaria de 2 mg para adultos) y de la sulfipirazona (1 mg diario) para la movilización de ácido úrico en la gota crónica, está bien establecido. En aproximadamente dos tercios de los pacientes, estos agentes causan la excreción del ácido úrico a una tasa suficientemente grande para exceder su tasa de formación y rápidamente disminuir su concentración plasmática. La administración intravenosa de dosis elevadas de estos fármacos a pacientes con gota puede causar un incremento 5 a 7 veces mayor en la eliminación renal de uratos, pero su administración oral continua duplica su excreción diaria. En pacientes con gota artrítica, hay un alto grado de recuperación con el PROB en cuanto al dolor a los movimientos articulados (Weiner, 1990).

El PROB también inhibe la secreción tubular de un gran número de fármacos, tales como la indometacina, el metotrexato, la difilina y el metabolito activo del clofibrato; sin embargo, no hay indicaciones clínicas para la co-administración de probenecid en muchas instancias. En el caso de un gran número de ácidos orgánicos endógenos y exógenos cuyas tasas de excreción están determinadas por propósitos diagnósticos, se pueden obtener valores engañosos si el paciente está recibiendo PROB.

En líquido cefalorraquídeo, el PROB es capaz de inhibir el transporte del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y de otros metabolitos ácidos de las monoaminas cerebrales desde el espacio subaracnoideo hacia el plasma. Este, en particular, ha sido tema de interés para algunos psicofarmacólogos (van der Poel et al., 1977). El transporte de fármacos tales como la penicilina G, puede también ser afectado por el PROB (Spector and Lorenzo, 1974).

Dado que el PROB y algunos de sus metabolitos pueden ser secretados dentro de la bilis, no es del todo sorprendente que este fármaco disminuya la secreción biliar de otros compuestos, incluyendo los agentes diagnósticos verde de indocianina y sulfobromoftaleina (BSP). La inhibición de la secreción biliar, además, tiene implicaciones en el uso de rifampina para el tratamiento de la tuberculosis. Concentraciones altas de este antibiótico son alcanzadas en plasma por la co-administración de PROB (Guarino and Schanker, 1968; Kenwright and Levi, 1973).

En 1989, McDonough y Button reportaron el bloqueo mediado por el PROB sobre el transporte del Fura-2 (un colorante fluorescente frecuentemente empleado en las mediciones *in vitro* del calcio citoplásmico) desde el citoplasma hacia el medio extracelular, incrementando así sustancialmente su eficacia en la reacción con el Ca^{2+} intracelular.

Más recientemente, Freitas y Bridges (1992) reportaron el empleo del PROB en un estudio encaminado a evaluar el acceso de hormonas, como la prolactina (PRL), al líquido cefalorraquídeo (LCR) de la rata. En este caso, el PROB produjo una interferencia

en el transporte de la PRL desde la sangre hacia el LCR, poniendo en evidencia la migración de la PRL desde la pituitaria hacia el LCR.

El PROB también es capaz de alterar la farmacocinética de la didesoxi-inosina, un didesoxinucleósido que inhibe la función de la transcriptasa inversa y que representa una alternativa terapéutica potencial en el tratamiento de los síntomas y las alteraciones metabólicas observadas en el complejo SIDA-encefalitis. El PROB produjo un incremento en las concentraciones de este inhibidor de la transcriptasa, tanto en el LCR como en cerebro de la rata (Galinsky et al., 1991).

De gran importancia fue el hallazgo de que la administración sistémica del PROB puede potenciar la acción anticonvulsivante del NBQX (un antagonista de los receptores glutamatérgicos subtipo AMPA) en ratones con crisis convulsivas inducidas por electroshocks, mediante un mecanismo de bloqueo del NBQX desde el sistema nervioso hacia la periferia (Taylor and Vartanian, 1992).

Sin embargo, la evidencias más importantes de los efectos producidos por el PROB en el sistema nervioso central, en términos de la justificación del presente trabajo, radican en su capacidad reportada de inducir incrementos dosis-dependientes en las concentraciones de KYNA, tanto en LCR y cerebro (Vécsei et al., 1992a), como en dialisados de cuerpo estriado de la rata (Miller et al., 1992), al ser este fármaco administrado sistémicamente sólo en dosis crecientes o a dosis fijas en combinación con dosis crecientes de KYN, por un mecanismo de acción que involucra el bloqueo del transporte del KYNA desde el

sistema nervioso hacia la periferia y su consecuente permanencia en el cerebro. Las concentraciones de KYNA alcanzadas en el sistema nervioso por este medio, son suficientemente altas para inhibir las convulsiones inducidas tanto por pentilentetrazol, como por NMDLA en ratones (Vécsei et al., 1992b).

Por otra parte, el PROB es completamente absorbido después de su administración oral. Las concentraciones pico de este fármaco en plasma se alcanzan en un período de 2 a 4 horas. La vida media de este fármaco en plasma es dosis-dependiente y varía desde menos de 5 horas a más de 8, sobre el rango terapéutico. Entre el 85 y el 95 % del PROB se une a la albúmina plasmática. La pequeña porción no unida incrementa su acceso al filtrado glomerular; una porción mucho más grande es secretada activamente por el túbulo proximal. La gran solubilidad en lípidos de su forma no-disociada resulta en su absorción virtualmente completa por difusión inversa, a menos que la orina sea alcalina. Una pequeña concentración de PROB glucurónido aparece en la orina; también puede ser hidroxilado a metabolitos que retienen su función carboxilo y tienen actividades uricosúricas (Israeli et al., 1972). Los parámetros farmacocinéticos del PROB en humanos son resumidos a continuación:

TABLA II. DATOS DE LA FARMACOCINETICA DEL PROBENECID EN HUMANOS *

Disponibilidad (oral)	(%)	100
Excreción urinaria	(%)	1.2 ± 0.2
Unión en plasma	(%)	No lineal, % no-unido = 26·C/(140+C), donde C es la [total] en µ/ml
Eliminación	(ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	$V_{\text{p}} = 23 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (libre) $K_{\text{m}} = 3.0 \pm 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (libre)
Volumen de distribución	(litros/kg)	0.17 ± 0.03 para la [total] del fármaco
Vida media	(horas)	Dosis-dependiente (a 200 µg/ml (pico de [] de 2 g de dosis oral, $t_{1/2} = 11.8$ h.
Concentraciones efectivas y concentraciones tóxicas aun sin determinar		
* Valores recopilados de <u>The pharmacological basis of therapeutics</u> (Weiner, 1990).		

Existe sin embargo, una consideración sobre el empleo del PROB: algunos fármacos de acción renal han sido asociados con el desarrollo de enfermedades glomerulares. El PROB, administrado crónicamente a dosis elevadas podría estar vinculado a la manifestación de síndrome nefrótico y a una gran variedad de lesiones glomerulares, desde cambios patológicos mínimos hasta una glomerulonefritis membranosa aguda (Weiner, 1990). Sin embargo, no ha sido fácil aún establecer una relación entre una causa directa y un efecto para el caso del PROB.

La dizocilpina como antagonista no competitivo de los receptores para NMDA

Se sabe que el bloqueo de los receptores para NMDA mediante el empleo de antagonistas puede prevenir el daño por isquemia en el cerebro, así como los movimientos epileptiformes en algunos modelos de neuropatías humanas (Schwarcz and Meldrum, 1985; Kemp et al., 1987). A raíz de la evidencia referente a la habilidad de los antagonistas no competitivos para NMDA (como son la ketamina, la fenciclidina (PCP) y la dizocilpina o MK-801) de prevenir las alteraciones morfológicas y conductuales producidas por el ácido kaínico en el cerebro de la rata (Clifford et al., 1990), una buena parte de las estrategias preventivas probadas contra la neurotoxicidad del QUIN se han orientado hacia el empleo de dichos agentes.

El mejor de estos fármacos probados hasta ahora es el MK-801, un antagonista no competitivo, selectivo de los receptores para NMDA, efectivo, en roedores, contra las convulsiones inducidas por electroshock, por bicuculina y por sonido, y con propiedades neuroprotectoras contra la isquemia cerebral y la muerte neuronal inducidas por excitotoxinas (Vezzani et al., 1989). El MK-801 también es capaz de prevenir completamente las alteraciones bioquímicas, morfológicas y conductuales inducidas *in vivo* por el QUIN (Susel et al., 1989; Giordano et al., 1990; Santamaría and Ríos, 1993) y su mecanismo de acción sobre los receptores para NMDA radica en el bloqueo mecánico selectivo del canal asociado al receptor, el cual es permeable a sodio y calcio.

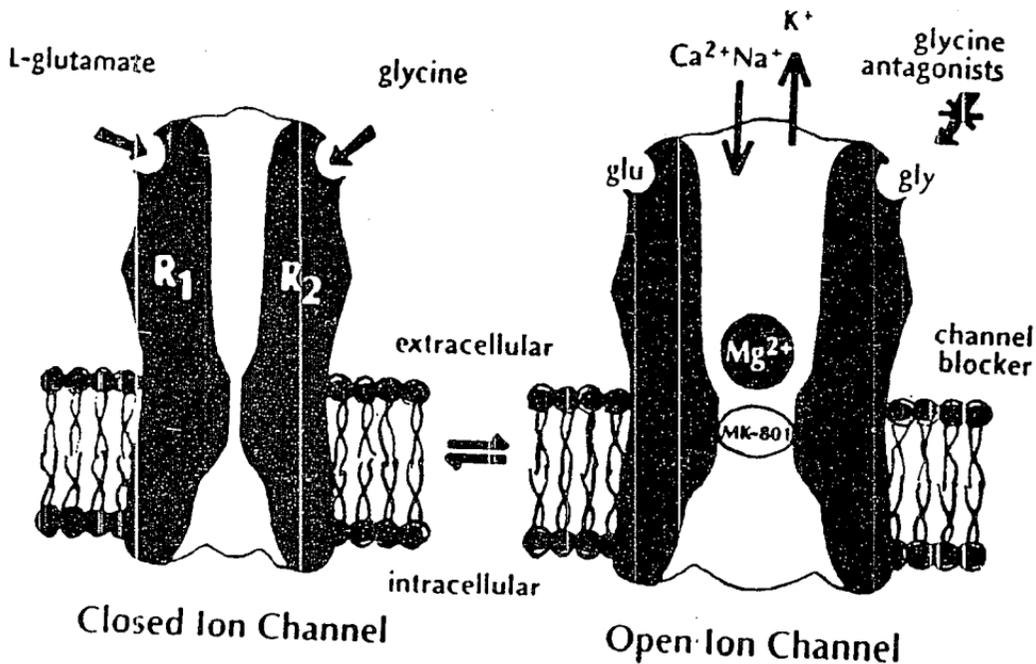


Figura 8. Mecanismo de bloqueo del receptor para NMDA por la dizocilpina (MK-801). Tomado del Research Biochemicals International (RBI) 1995 Catalog/Handbook.

Con respecto a la caracterización de algunos de los parámetros farmacocinéticos de este agente en la rata (Vezzani et al., 1989), se ha observado que los picos máximos de concentración plasmática después de su administración i.p. se alcanzan entre los 10 y los 30 minutos. La declinación de su concentración plasmática es aparentemente bifásica con un $T_{1/2}$ de eliminación terminal de 1.9 horas. Suponiendo su completa absorción desde el sitio de inyección hacia la circulación sistémica, el volumen de distribución de su estado estacionario es de 23.1 litros/kg y su eliminación aparentemente total es de 162.9 ml/kg/min. Finalmente, el $T_{1/2}$ de eliminación en el cerebro fue de 2.05 horas y su concentración cerebral excedió la plasmática en aproximadamente 10 a 15 veces más, explicando así su eficacia selectiva en el sistema nervioso central.

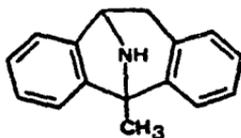


Figura 9. Estructura química del MK-801.

Por estudios de unión (binding), se ha observado que la unión del MK-801 a sus sitios de reconocimiento de alta afinidad presentes en el receptor para NMDA, depende completamente de la activación previa de dicho receptor (Kemp et al., 1987).

Sin embargo, a pesar de su probada potencia antagónica y preventiva sobre los efectos del QUIN (Beal et al., 1988), el tratamiento crónico de animales de experimentación con este fármaco produce un incremento considerable en la pérdida de receptores dopaminérgicos estriatales tipo D1 inicialmente inducida por el QUIN (Norman et al., 1990a), presumiblemente debido a una sobre-regulación del receptor a NMDA mediada por el MK-801, convirtiéndole en un receptor hipersensible a la acción de los agonistas, exhibiendo así un efecto tóxico secundario. Por ello, la posibilidad de considerar a este agente como una alternativa terapéutica en el tratamiento de neuropatías asociadas a los receptores para NMDA ha sido descartada. Adicionalmente, se han reportado efectos ansiolíticos y simpatomiméticos inducidos por este fármaco en roedores (Vezzani et al., 1989).

Planteamiento integrativo

La activación de los receptores para aminoácidos excitadores en el cerebro de los mamíferos ha sido postulada como un mecanismo citotóxico involucrado en los procesos neurodegenerativos (Coyle and Puttfarcken, 1993). El metabolito endógeno del L-triptofano formado en la vía de la kinurenina, el ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín dicarboxílico, QUIN), es un agonista de los receptores glutamatérgicos para N-metil-D-aspartato (NMDA) que además actúa como una potente excitotoxina (Schwarcz et al., 1984; Stone, 1993). El QUIN tiene la potencia excitadora suficiente para inducir una amplia variedad de efectos

tóxicos, tales como la disminución en el contenido cerebral de ácido Gama-aminobutírico (GABA), el incremento en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} , la disminución de ATP, el incremento en el estrés oxidativo neuronal y finalmente, la muerte celular (Foster et al., 1983; Schwarcz et al., 1984; During et al., 1989; Ríos and Santamaría, 1991; Santamaría and Ríos, 1993).

Se ha propuesto recientemente que tanto el QUIN como la vía metabólica de la kinurenina están implicados en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas (Moroni et al., 1986; Schwarcz et al., 1988; Stone and Connick, 1985), infecciosas e inflamatorias (Heyes et al., 1990; Heyes and Lackner, 1990; Heyes et al., 1992; Ogawa et al., 1992). El QUIN es además comúnmente empleado como un modelo para reproducir las características neuroquímicas, histopatológicas y conductuales de la enfermedad de Huntington cuando es administrado intraestriatalmente a ratas y a primates no humanos (Schwarcz et al., 1983; Beal et al., 1986; Hantraye et al., 1990; Ferrante et al., 1993).

Existen múltiples evidencias en la literatura que demuestran que un incremento en la concentración del metabolito endógeno relacionado con el QUIN, el ácido kinurénico (KYNA), en los espacios extracelulares, puede reducir sustancialmente la función del receptor para NMDA (Russi et al., 1989; Russi et al., 1992; Carpenedo et al., 1994). Más aún, la neurotoxicidad inducida por el QUIN, tanto *in vivo* como *in vitro*, puede ser bloqueada por el KYNA, el cual actúa como antagonista sobre los receptores para NMDA, uniéndose al sitio de la glicina (Foster et al., 1984;

Lekieffre et al., 1990). Sin embargo, parece ser que el KYNA tiene una habilidad limitada para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) desde la periferia hacia el sistema nervioso central (Swartz et al., 1990; Fukui et al., 1991), mientras que su precursor inmediato, la kinurenina (KYN), cruza efectivamente la BHE, produciendo además un incremento dosis-dependiente en las concentraciones cerebrales de KYNA (especialmente en el cuerpo estriado) por la vía de la transaminación irreversible de este metabolito precursor (Miller et al., 1992).

Por otra parte, la administración sistémica del probenecid (PROB), un conocido bloqueador del transporte activo de ácidos orgánicos, es capaz de inhibir la excreción del KYNA desde el fluido extracelular, resultando en un incremento en el contenido cerebral de dicho antagonista (Moroni et al., 1988; Vécsei et al., 1992a). Se ha demostrado recientemente que el PROB también es capaz de potenciar la acción preventiva del NBQX (un conocido antagonista glutamatérgico tipo AMPA) sobre las convulsiones inducidas en ratones por electroshock (Taylor and Vartanian, 1992). Incrementos en las concentraciones cerebrales de KYNA capaces de prevenir las convulsiones inducidas en ratas tanto por pentilentetrazol como por NMDLA, dos potentes agentes excitadores, pueden ser obtenidas por la co-administración intraperitoneal de KYN + PROB (Miller et al., 1992).

Nuestro grupo ha descrito con anterioridad y en forma de resultados preliminares, efectos parcialmente protectores de la administración tanto de PROB (Kravzov et al., 1993) como de KYN (Santamaría et al., 1994), sobre la neurotoxicidad inducida por

el QUIN.

En el presente trabajo, dosis crecientes de KYN y PROB, administradas sistémicamente, por separado o en combinación, fueron empleadas para atenuar la neurotoxicidad inducida por el QUIN sobre el cuerpo estriado de ratas machos adultos.

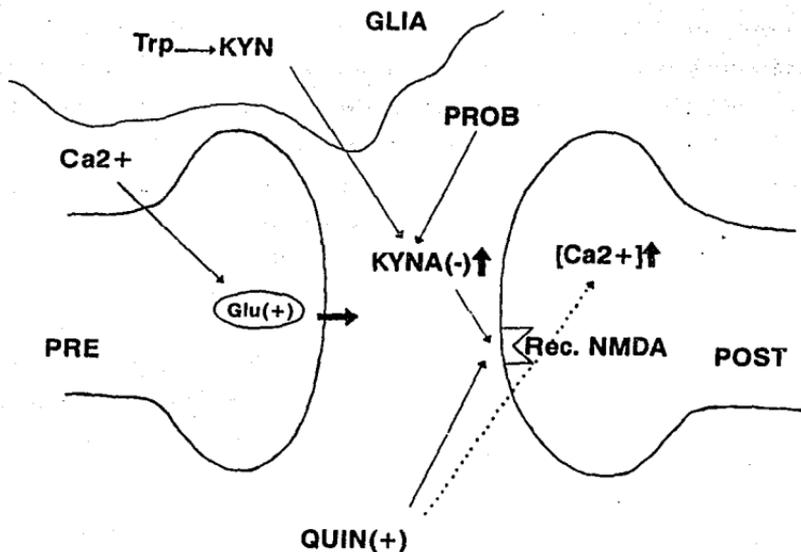


Figura 10. Esquema integrativo mostrando los mecanismos hipotéticos de acción de la kinurenina y del probenecid para el bloqueo de los receptores para NMDA por el incremento en los niveles de ácido kinurénico en el Sistema Nervioso Central.

H I P O T E S I S

a) De acuerdo a los antecedentes descritos, se postula que los pretratamientos con D,L-kinurenina, probenecid y la coadministración de estos fármacos a diferentes dosis proporcionarán protección contra la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico en términos de la conducta de rotación y de la disminución estriatal de GABA y otros aminoácidos, mediante un doble mecanismo de acción vinculado a la síntesis y acumulación de ácido kinurénico en el sistema nervioso central de la rata.

b) El efecto producido por ambos fármacos debe ser dosis-dependiente y la coadministración de ambos fármacos a dosis bajas producirá un efecto protector sobre los parámetros experimentales evaluados.

O B J E T I V O S

Objetivo general

1) Evaluar el posible efecto protector de la administración sistémica de la D,L-kinurenina y del probenecid sobre la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico en la rata.

Objetivos particulares

1.a.) Estudiar el efecto de los pretratamientos con D,L-kinurenina, probenecid, y la coadministración de ambos fármacos sobre la conducta de rotación inducida por la inyección intraestriatal de ácido quinolínico en la rata.

1.b.) Analizar el efecto de los pretratamientos con D,L-kinurenina, probenecid, y la coadministración de ambos fármacos sobre la disminución en el contenido estriatal de aminoácidos inducida por el ácido quinolínico en la rata.

M A T E R I A L Y M E T O D O

Materiales

Todos los materiales empleados en este estudio, incluyendo los aparatos, reactivos y animales, fueron obtenidos del Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (I.N.N.N. M.V.S.).

Animales

Ratas Wistar machos obtenidas del Bioterio del I.N.N.N. M.V.S., pesando 200-250 g, fueron empleadas para todos los experimentos. Los animales fueron mantenidos, cinco por caja, en cajas de acrílico y provistos de Chow Purina y agua ad libitum. El cuarto del Bioterio fue mantenido bajo condiciones de temperatura constante ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y ciclos de luz-obscuridad (12:12 horas).

Reactivos

Agua desionizada, obtenida a partir de un sistema purificador Milli R-Q de Millipore, fue empleada para la preparación de todos los reactivos y soluciones. El ácido quinolínico (QUIN), la D,L-kinurenina (KYN), el probenecid (PROB), la apomorfina (APO), el o-ftaldialdehído (OPA), el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), el 2-mercaptoetanol y un kit de estándares de L-aminoácidos para cromatografía fueron obtenidos de Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO). La dizocilpina (MK-801) se obtuvo de Research Biomedicals Incorporated (Natick, MA). El

resto de los reactivos fueron obtenidos de E. Merck (México).

Métodos

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Neuroquímica del I.N.N.N., M.V.S.

Pretratamientos y microinyección estriatal de ácido quinolínico

La KYN, el PROB y el MK-801 fueron disueltos en salina-hidróxido de sodio 0.1 N y el pH de cada solución fue ajustado a 10.0 con ácido clorhídrico. Las ratas (n=5-9 por grupo) fueron pretratadas intraperitonealmente con PROB (100, 200 o 300 mg/kg), KYN (150, 300 o 450 mg/kg) o la combinación de KYN + PROB (150 o 300 + 100 mg/kg, respectivamente) 2 horas antes de la microinyección intraestriatal de QUIN. Los animales control recibieron vehículo al mismo pH. Después de los pretratamientos, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). El QUIN fue disuelto en 0.1 M de sol. salina-buffer de fosfatos (SBF) y ajustado a pH 7.4 con 0.1 N de NaOH. Inyecciones unilaterales únicas de 1 μ l de QUIN fueron aplicadas con una microjeringa Hamilton de 10 μ l en el estriado derecho de los animales a las siguientes coordenadas estereotáxicas: 0.5 mm anterior a bregma, 2.6 mm lateral a bregma y 4.5 mm ventral a la dura, de acuerdo al atlas estereotáxico del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1984). El QUIN fue microinyectado durante un período de dos minutos, la aguja fue mantenida en el sitio de inyección durante dos minutos más al término de los cuales fue

removida lentamente. Animales control fueron similarmen-
te microinyectados con SBF al mismo pH.

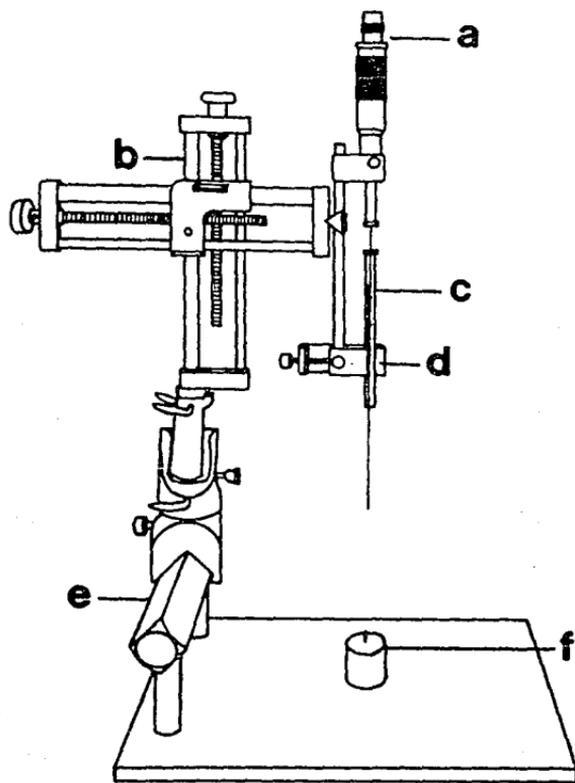


Figura 11. Sistema de microinyección: a) micrómetro, b) torre estereotáxica, c) microjeringa de 10 μ l, d) sujetador de microjeringa, e) barra estereotáxica y f) cero estereotáxico.

Evaluación de la conducta de rotación

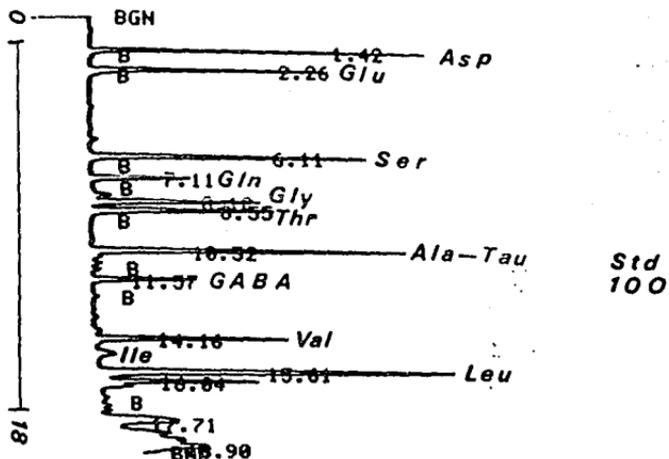
Seis días después de la microinyección del QUIN, los animales de todos los grupos de tratamientos fueron administrados con APO (1 mg/kg, s.c.), separados en cajas de acrílico individuales y cinco minutos después, el número de rotaciones ipsilaterales hacia el estriado lesionado fue registrado cada cinco minutos durante una hora, de acuerdo a reportes previos (Norman et al., 1990b). Cada rotación fue definida como un giro completo de 360° sobre su propio eje. A las coordenadas empleadas en este estudio para lesionar el cuerpo estriado, la administración de APO a las ratas produce una conducta de rotación ipsilateral en dirección al lado lesionado (Susel et al., 1989; Santamaría and Ríos, 1993).

Análisis del contenido estriatal de aminoácidos

Siete días después de la administración de QUIN, los animales de todos los grupos de tratamientos fueron inyectados con MPA (1.2 mmol/kg, i.v.), un inhibidor de la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), con la finalidad de prevenir un incremento *postmortem* de GABA (van der Heyden and Korf, 1978). Dos minutos después, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y sus cerebros removidos. Los estriados derechos fueron disecados en hielo, pesados y homogenizados en 15 volúmenes de metanol-agua (85 %, v/v). Las muestras fueron entonces centrifugadas (3,000 g durante 15 min) y las alícuotas de los sobrenadantes fueron almacenadas a -5°C hasta la

realización del análisis cromatográfico.

El contenido estriatal de aminoácidos fue analizado por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección fluorométrica, como ha sido frecuentemente descrito (Fleury and Ashley, 1983; Smith and Panico, 1985). Para el procedimiento de derivatización precolumna, 100 μ l del reactivo de OPA (conteniendo 5 mg de OPA + 625 μ l de metanol + 5.6 ml de buffer de boratos 0.4 M, pH 9.5 + 25 μ l de 2-mercaptoetanol) fueron adicionados a 100 μ l de los sobrenadantes de tejido estriatal. Después de agitación continua durante 1 min, 20 μ l de la mezcla fueron inyectados con una microjeringa Hamilton de 25 μ l a un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer Serie 3B. Se empleó una precolumna OPA-HS Alltech de fase reversa con un tamaño de partícula de 3 μ m. Se usó un programa de gradiente lineal para eluir aminoácidos-OPA, llenando desde el 10 % hasta el 65 % de metanol. La mezcla del gradiente consistió en: a) solución 50 mM de buffer de acetato de sodio (pH 5.9) conteniendo 1.5 % v/v de tetrahidrofurano, y b) metanol grado HPLC. Los niveles de fluorescencia fueron medidos con un detector de fluorescencia Beckman 157.



INST 1 METH 1 FILE 12

RUN 5 3 : 14.7 0 / 0 / 0

SENSITIVITIES 500 40

TIME	AREA	BC	RRT	RF	C	NAME
* 1.42	0.2291		0.142	1.000	6.7401	!
* 2.26	0.2236		0.226	1.000	6.5789	!
6.11	0.3390		0.611	1.000	9.9725	!
7.11	0.1133		0.711	1.000	3.3324	!
8.18	0.2210	U	0.818	1.000	6.5013	!
8.55	0.2213		0.855	1.000	6.5089	!
10.32	0.3775		1.032	1.000	11.1037	!
* 11.57	0.1024		1.157	1.000	3.0136	!
14.16	0.2390	U	1.416	1.000	7.0313	!
15.61	0.5886	T	1.561	1.000	17.3138	!

Figura 12. Ejemplo de un cromatograma de estándares de aminoácidos obtenido empleando concentraciones fijas de 100 ng/ml para cada a.a. También se presentan los tiempos de elución y las áreas bajo las curvas correspondientes. Asp = aspartato, Glu = glutamato, Ser = serina, Gln = glutamina, Gly = glicina, Thr = treonina, Ala-Tau = alanina-aurina, GABA = ácido Gama-aminobutírico, Val = valina y Leu = leucina.

Análisis estadístico

La conducta de rotación fue analizada usando una prueba de Kruskal-Walis seguida por una prueba de Mann-Whitney (Siegel, 1980). Los datos del contenido estriatal de aminoácidos fueron analizados empleando un análisis de varianza de una vía (ANOVA simple) seguido por una prueba de Tukey para comparaciones múltiples (Steel and Torrie, 1980). Valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ fueron considerados con significancia estadística.

R E S U L T A D O S

Efecto de los pretratamientos con D,L-kinurenina, probenecid y dizocilpina en la conducta de rotación

Los resultados de la administración sistémica de la dizocilpina y de dosis crecientes de probenecid sobre la conducta de rotación inducida por el ácido quinolínico se muestran en la Figura 13.

Los animales lesionados con QUIN desarrollaron una marcada conducta de rotación (212 ± 28 giros ipsilaterales/1 hora, media \pm error estándar) después de la administración de la apomorfina.

El PROB administrado solo, tuvo un efecto protector contra la conducta de giro inducida por el QUIN a las dosis de 200 y 300 mg/kg (26 % y 59 % de disminución, respectivamente) (ver Figura 13).

Por su parte, el MK-801 fue capaz de prevenir completamente la conducta de rotación inducida por la inyección del QUIN (96 % vs los animales tratados con QUIN) (ver Figura 13).

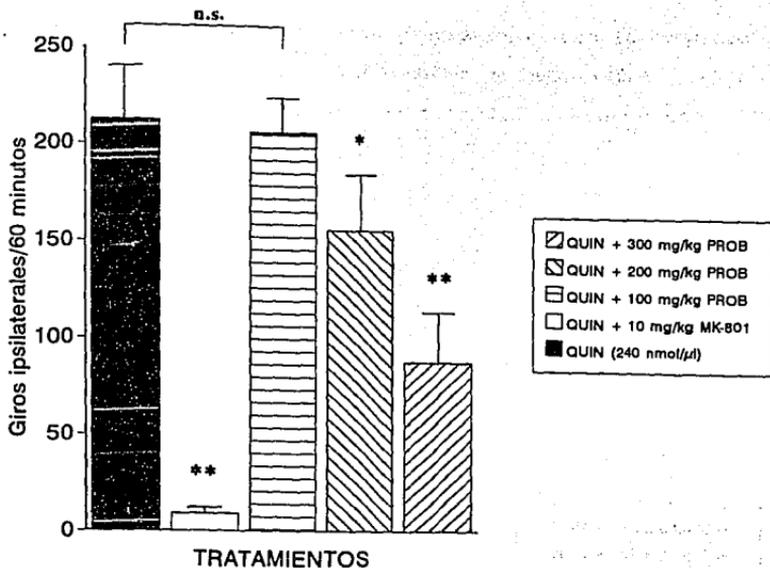


Fig. 13. Efecto de la dizocilpina y de dosis crecientes de probenecid (PROB) sobre la conducta de rotación inducida por el ácido quinolínico. Se presentan valores medios de $n=6-9$ experimentos independientes \pm S.E.M. Diferencias contra el valor control, * $p<0.05$, ** $p<0.01$; ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba U de Mann-Whitney; n.s. = no significativo.

Los efectos de la administración sistémica de dosis crecientes de la D,L-kinurena y de la co-administración de KYN + PROB sobre la conducta de rotación se muestran en la Figura 14. El pretratamiento de los animales con KYN a las dosis de 300 y 450 mg/kg (pero no así a la dosis de 150 mg/kg) disminuyó significativamente las rotaciones inducidas por el QUIN (33 % y 59 % de disminución en comparación con las ratas tratadas con QUIN, respectivamente) (ver Figura 14). La misma tendencia fue

observada en los grupos de ratas pretratadas con la combinación de 150 o 300 mg/kg de KYN + 100 mg/kg de PROB (40 % y 76 % de disminución de los giros vs los animales tratados con QUIN, respectivamente) (ver Figura 14).

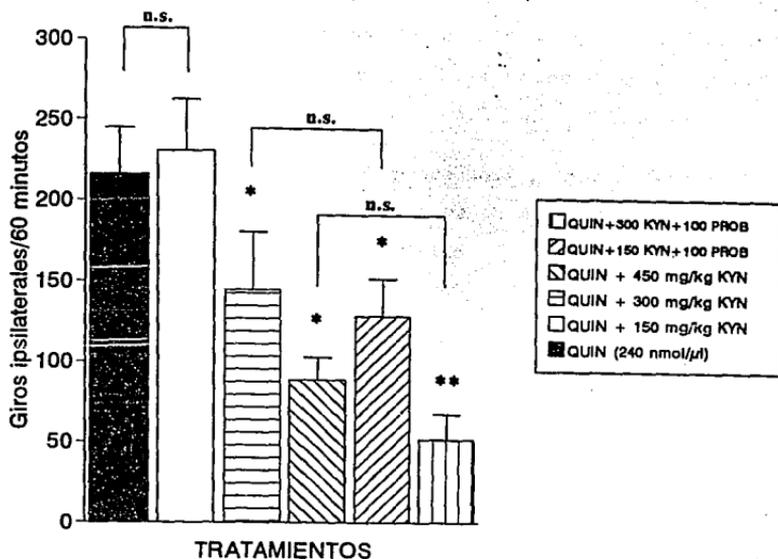


Fig. 14. Efecto de dosis crecientes de DL-kinurenia (KYN) y de la co-administración de KYN + probenecid (PROB) sobre la conducta de rotación inducida por el ácido quinolínico. Se presentan valores medios de n=6-9 experimentos independientes \pm S.E.M. Diferencias contra el valor control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba U de Mann-Whitney; n.s. = no significativo.

Los animales control administrados intraestriatalmente con solución salina-buffer de fosfatos, mostraron irritabilidad y conducta de excitación después de la inyección de APO, de acuerdo a lo reportado por Norman et al. (1990b), pero no expresaron conducta de rotación alguna.

Los animales pretratados con MK-801 mostraron depresión, pero ninguno de los otros fármacos administrados como pretratamientos a los animales inyectados con SBF produjo conducta rotacional.

Efecto de la D,L-kinurena, el probenecid y la dizocilpina sobre la disminución estriatal de GABA inducida por el ácido quinolínic

El contenido basal de GABA en el cuerpo estriado de los animales control (tratados intraestriatalmente con SBF) fue establecido a los $225.1 \pm 16.7 \mu\text{g/g}$ de tejido (media \pm error estándar).

Como se muestra en la Figura 15, se encontró una disminución significativa en el contenido estriatal de GABA (-56 % vs valores control) en animales tratados con QUIN. La Figura 15 también muestra el efecto dosis-dependiente del PROB a las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg sobre la disminución en el contenido de GABA inducida por el QUIN. Sólo las dosis de 200 y 300 mg/kg protegieron a las ratas contra la toxicidad del QUIN (39 % y 91 % vs los animales tratados con QUIN, respectivamente).

El MK-801, a la dosis única de 10 mg/kg, fue completamente efectivo en la prevención de la neurotoxicidad inducida por el

QUIN (ver Figura 15), evaluada en términos de la disminución de GABA (121 % vs los animales tratados con QUIN y -1 % vs valores control)

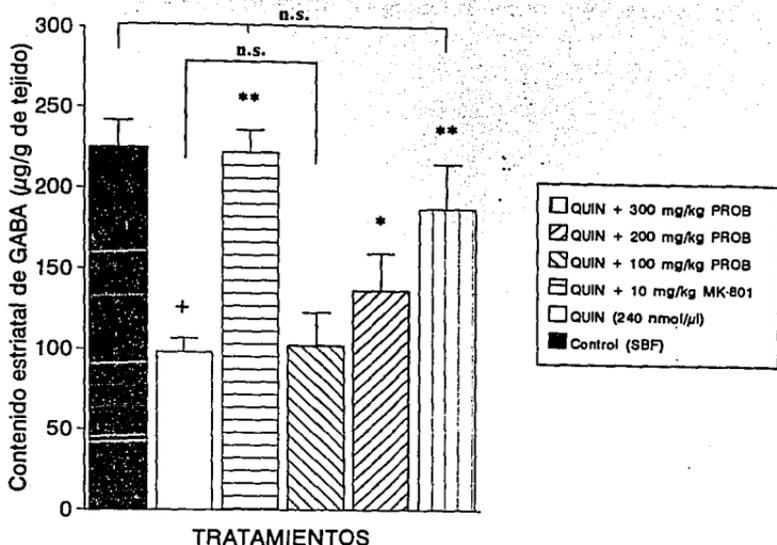


Fig. 15. Efecto de la dizocilpina y de dosis crecientes de probenecid (PROB) sobre la disminución de GABA estriatal inducida por el ácido quinolínico. Se presentan valores medios de n=5-8 experimentos independientes \pm S.E.M., + p<0.01, tratamiento con QUIN diferente del valor control; * p<0.05, ** p<0.01, diferencias contra el tratamiento con QUIN, prueba de Tukey; n.s.= no significativo.

A las dosis de 300 y 450 mg/kg (ver Figura 16), la KYN previno parcialmente la disminución estriatal de GABA inducida por el QUIN (58 % y 85 % vs los animales tratados con QUIN, respectivamente), sin embargo, la dosis de 150 mg/kg de KYN no fue efectiva en la atenuación de los efectos del QUIN sobre el

contenido de GABA.

Las combinaciones de KYN (150 o 300 mg/kg) + PROB (100 mg/kg) resultaron ser parcialmente protectoras (25 % y 79 % vs animales tratados con QUIN, respectivamente) (ver Figura 16).

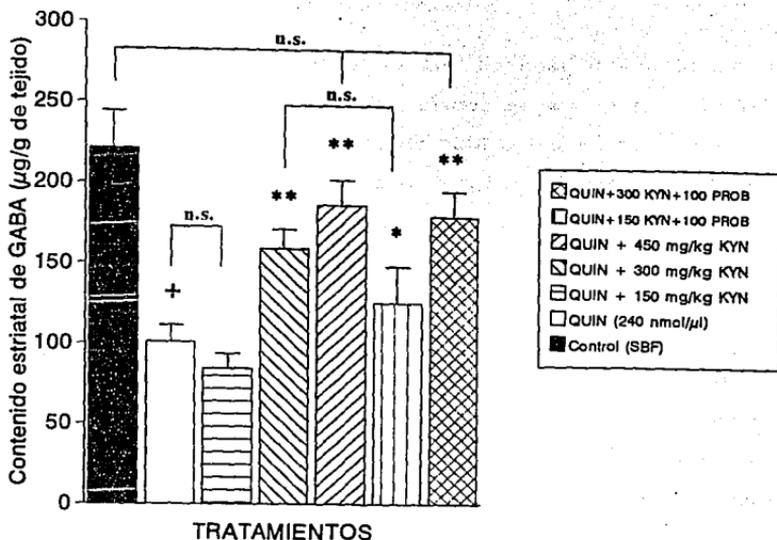


Fig. 16. Efecto de dosis crecientes de DL-kinurenine (KYN) y de la co-administración de KYN + probenecid (PROB) sobre la disminución estriatal de GABA inducida por el ácido quinolínico. Se presentan valores medios de $n=5-8$ experimentos independientes \pm S.E.M., + $p < 0.01$, tratamiento con QUIN diferente del valor control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, diferencias contra el tratamiento con QUIN, prueba de Tukey; n.s. = no significativo.

Finalmente, la administración sistémica de todos estos fármacos a las dosis empleadas en este estudio, a animales control microinyectados con SBF no tuvo efecto alguno sobre el contenido basal de GABA en el cuerpo estriado (dato no mostrado).

Efecto de la D,L-kinurenina, el probenecid y la dizocilpina sobre la disminución estriatal de glutamato y aspartato inducida por el ácido quinolínic.

El contenido estriatal de los aminoácidos glutamato y aspartato, expresado en $\mu\text{g/g}$ de tejido, es mostrado en la Tabla III. La inyección intraestriatal de QUIN a los animales disminuyó significativamente el contenido de glutamato en un -44 % al compararse contra valores control, mientras que el aspartato fue disminuído en su contenido en un -43 %, también vs valores control (ver Tabla III).

La disminución en el contenido estriatal de glutamato inducida por el QUIN fue completamente bloqueada por los pretratamientos con 10 mg/kg de MK-801, 300 y 450 mg/kg de KYN y la combinación de 300 mg/kg de KYN + 100 mg/kg de PROB (83.6 %, 64.4 %, 70.2 % y 67.0 % vs los animales tratados con QUIN, respectivamente). Efectos parciales en la prevención de la disminución del glutamato fueron observados en los animales pretratados con 100, 200 y 300 mg/kg de PROB y la combinación de 150 mg/kg de KYN + 100 mg/kg de PROB (47.9 %, 39.8 %, 28.9 % y % de prevención vs tratamiento con QUIN, respectivamente). Los pretratamientos con 150 mg/kg de KYN y la combinación de 150 mg/kg de KYN + 100 mg/kg de PROB resultaron ambos totalmente

inefectivos en la prevención de la toxicidad del QUIN sobre el glutamato (-7 % y -1 % vs tratamiento con QUIN, respectivamente) (ver Tabla III).

La Tabla III también muestra las concentraciones estriatales de aspartato después de los diferentes tratamientos experimentales. La pre-administración de MK-801 (10 mg/kg), PROB (200 y 300 mg/kg) y la combinación de KYN (300 mg/kg) + PROB (100 mg/kg) a animales inyectados estriatalmente con QUIN resultó en una prevención casi total de la disminución de aspartato (57.7 %, 76.2 %, 63.5 % y 67.1 % de protección vs tratamiento con QUIN, respectivamente).

Se obtuvo prevención parcial significativa en los pretratamientos con 450 mg/kg de KYN, 100 mg/kg de PROB y la combinación de KYN (150 mg/kg) + PROB (100 mg/kg) (43.9 %, 31.1 % y 24.9 % vs QUIN, respectivamente). El resto de los pretratamientos no fueron capaces de prevenir la pérdida estriatal de aspartato.

Efectos dosis-dependientes en la prevención de la toxicidad del QUIN fueron observados después de la administración de las diferentes dosis de KYN sobre el contenido estriatal de los dos aminoácidos evaluados, pero no así con las diferentes dosis de PROB.

TABLA III. EFECTO DE LA KINURENINA Y DEL PROBENECID SOBRE EL CONTENIDO ESTRIATAL DE AMINOACIDOS EN RATAS LESIONADAS TOPICAMENTE POR ACIDO QUINOLINICO

Tratamiento	Concentración de aminoácidos ($\mu\text{g/g}$ de tejido)	
	Glutamato	Aspartato
Control (SFB)	1472.2 \pm 93.6	257.7 \pm 30.8
QUIN (240 nmol/ μl)	820.3 \pm 47.8 †	146.2 \pm 10.5 †
QUIN+MK-801 (10 mg/kg)	1506.3 \pm 102.3 **	224.2 \pm 7.3 **
QUIN+KYN (150 mg/kg)	756.5 \pm 161.5	157.3 \pm 16.2
QUIN+KYN (300 mg/kg)	1348.5 \pm 127.5 *	164.0 \pm 11.0
QUIN+KYN (450 mg/kg)	1396.4 \pm 117.0 *	210.4 \pm 27.5 **
QUIN+PROB (100 mg/kg)	1213.5 \pm 321.4	191.7 \pm 30.8 *
QUIN+PROB (200 mg/kg)	1146.4 \pm 82.5 **	250.5 \pm 50.3 *
QUIN+PROB (300 mg/kg)	1057.5 \pm 143.2 *	239.0 \pm 36.1 *
QUIN+KYN (150)+PROB (100)	812.9 \pm 56.0	182.6 \pm 23.5 *
QUIN+KYN (300)+PROB (100)	1369.8 \pm 184.9 *	244.3 \pm 13.6 **

Las concentraciones de glutamato y aspartato fueron evaluadas por CLAR en tejido estriatal 7 días después de la inyección tónica de 1 μl de salina-buffer de fosfatos (SBF) o de ácido quinolinico (QUIN) a las ratas. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de 5-14 experimentos independientes. † tratamiento con QUIN vs valor control, $p < 0.01$; diferencias vs tratamiento con QUIN * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, prueba de Tukey; n.s. = no significativo.

Finalmente, la administración de estos pretratamientos a ratas tratadas intraestriatalmente con SFB no produjo alteración alguna en el contenido basal de ninguno de estos dos aminoácidos.

Asociación de los efectos del PROB y de la KYN sobre el contenido estriatal de GABA y la conducta de rotación

Con la finalidad de comparar de manera cuantitativa los efectos producidos por las diferentes dosis de los fármacos empleados en este estudio y hallar así una posible asociación entre la prevención de la disminución estriatal de GABA y la conducta de rotación, los promedios de los resultados obtenidos en cada condición experimental evaluada fueron comparados contra sus valores control y expresados en términos porcentuales. Entiéndase por asociación aquella relación de los efectos estudiados en términos fisiológicos. Los porcentajes corresponden al grado de prevención de la neurotoxicidad inducida por el QUIN en términos, tanto de la disminución en el contenido estriatal de GABA, como de la conducta rotacional.

La Figura 17 muestra la asociación porcentual en la prevención de la neurotoxicidad inducida por el QUIN en presencia de diferentes dosis de PROB. Con la dosis de 100 mg/kg de PROB la prevención de la neurotoxicidad es prácticamente nula. Por su parte, las dosis de 200 y 300 mg/kg de PROB resultaron ser significativamente preventivas en los parámetros evaluados; sin embargo, la asociación entre los niveles de GABA y los giros ipsilaterales es parcial, particularmente a la dosis más alta (ver Figura 17), a la cual, la prevención de la disminución de GABA alcanza casi el 100 %, mientras que la conducta rotacional es prevenida tan solo en un 60 %.

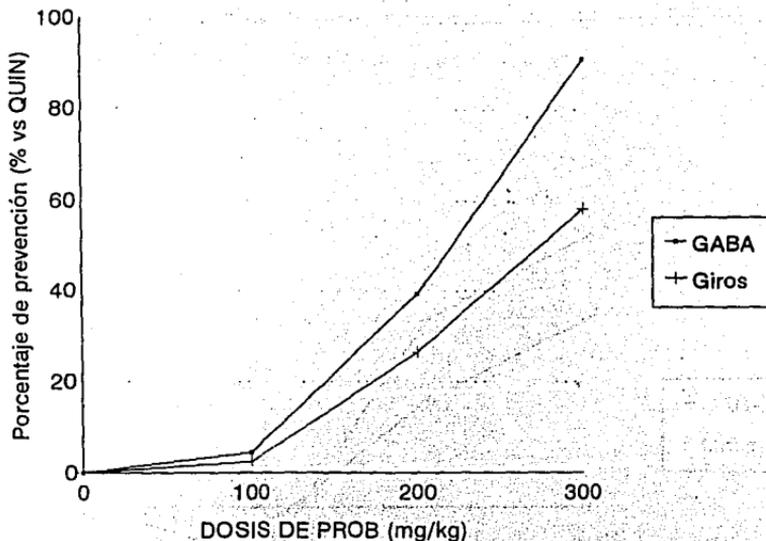


Fig. 17. Asociación porcentual del efecto preventivo de dosis crecientes de probenecid (PROB) sobre la disminución estriatal de GABA y la conducta de rotación inducidas por la inyección intraestriatal de 240 nmol/ μ l de ácido quinolinico (QUIN) en la rata.

La asociación entre los efectos evaluados en presencia de dosis crecientes de kinurenina es mostrada en la Figura 18. La misma tendencia observada con dosis crecientes de probenecid se observó con las diferentes dosis de kinurenina. Se obtuvo asociación parcial entre los giros y los niveles estriatales de GABA a la dosis de 300 mg/kg de KYN. No se observó efecto alguno en la prevención de la neurotoxicidad inducida por el QUIN en

términos porcentuales a la dosis de 150 mg/kg. Por su parte, a la dosis más alta de KYN (450 mg/kg), la diferencia en la asociación porcentual entre ambos parámetros alcanza más de un 20 %, lo cual establece una relación de evidente parcialidad.

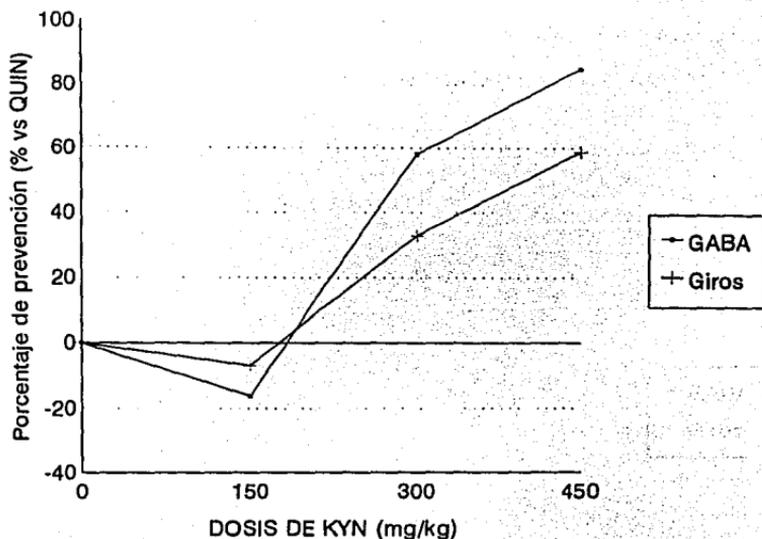


Fig. 18. Asociación porcentual del efecto preventivo de dosis crecientes de kinurenina (KYN) sobre la disminución estriatal de GABA y la conducta de rotación inducidas por la inyección intraestriatal de 240 nmol/ μ l de ácido quinolínico (QUIN) en la rata.

Con respecto a la coadministración de los pretratamientos con PROB más dosis crecientes de KYN, la asociación porcentual en los parámetros estudiados se presenta en la Figura 19. Se observa una relación parcial entre los efectos a las dosis de 100 + 150 mg/kg respectivamente, mientras que un alto grado de asociación se observa a las dosis de 100 de PROB + 300 mg/kg de KYN. Por su parte, la administración sistémica de 100 mg/kg de PROB solo no tuvo efecto alguno sobre la prevención de los niveles estriatales de GABA o sobre la conducta de rotación (ver Figura 19).

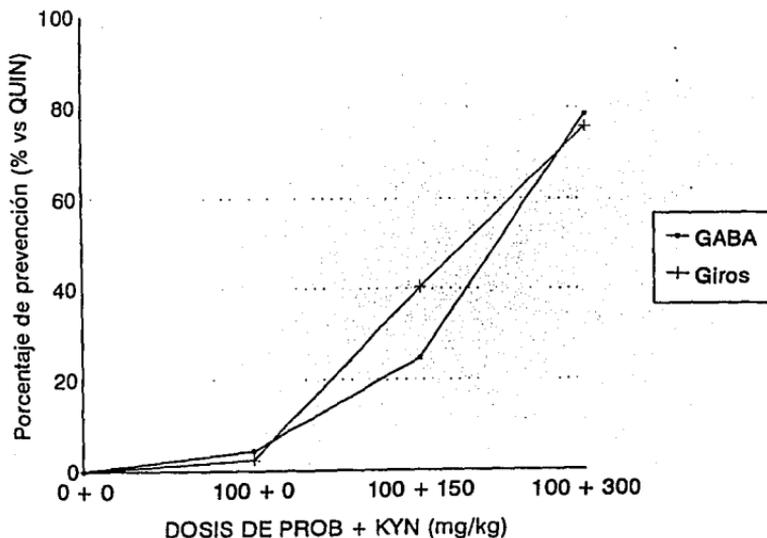


Fig. 19. Asociación porcentual del efecto preventivo de la coadministración de probenecid (PROB) + dosis crecientes de kinurenina (KYN) sobre la disminución estriatal de GABA y la conducta de rotación inducidas por la inyección intraestriatal de 240 nmol/ μ l de ácido quinolínico (QUIN) en la rata.

D I S C U S I O N

Los resultados del presente estudio demuestran la habilidad del probenecid para atenuar la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico, misma que es evidenciada tanto por los hallazgos conductuales (conducta de rotación), como por los neuroquímicos (niveles estriatales de GABA). De lo anterior, se postula que el efecto protector del probenecid sobre la neurotoxicidad del ácido quinolínico se debe a un incremento en el contenido estriatal extracelular de ácido kinurénico (Miller et al., 1992), el cual, a su vez, puede actuar sobre los receptores para NMDA, antagonizando los efectos tóxicos del quinolinato. Esta propuesta está reforzada por la potenciación observada en este estudio del efecto protector del probenecid por la co-administración con kinurenina, tomando en consideración la evidencia de que la administración sistémica de kinurenina también incrementa el contenido cerebral de ácido kinurénico (Vécsei et al., 1992a). En este contexto, se postula que los efectos observados sobre la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico después de la co-administración de ambos fármacos corresponde a un modelo aditivo.

Los efectos protectores mediados tanto por el probenecid, como por la kinurenina descritos en este trabajo, fueron dosis-dependientes, remarcando la posible existencia de una relación entre el incremento inducido farmacológicamente en las concentraciones cerebrales de ácido kinurénico y la reducción en la función de los receptores para NMDA. Por lo anterior, los

efectos parciales obtenidos por la administración de ambos agentes por separado pueden ser justificados en términos de la ocupación gradual y dosis-dependiente de los sitios alostéricos de unión a moduladores (fundamentalmente a la glicina) en los receptores para NMDA por el ácido kinurénico.

La administración periférica de las dosis más altas tanto de kinurenina (450 mg/kg) como de probenecid (300 mg/kg) por separado, resultan en una prevención casi total de la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico, constituyendo las dosis óptimas necesarias para alcanzar mejoría significativa en los parámetros fisiológicos y neuroquímicos analizados en este trabajo. Efectos similares fueron observados en animales administrados con 300 mg/kg de kinurenina en combinación con 100 mg/kg de probenecid, sugiriendo que ambos fármacos, cuando son co-administrados, pueden contribuir individualmente al mismo efecto protector, idea que está apoyada por los efectos parciales inducidos por estos fármacos a las mismas dosis, cuando se administran por separado. Más aún, a partir de estos resultados, y con base en reportes previos (Miller et al., 1992; Vécsei et al., 1992b), en los cuales se han correlacionado las concentraciones estriatales de ácido kinurénico después de la administración sistémica de estos dos fármacos, se puede postular una doble estrategia preventiva de la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico que involucra tanto la síntesis como la acumulación de kinurenato en el cerebro, así como el posterior bloqueo de los receptores para NMDA.

Un punto de gran importancia a este respecto es la relación que se establece entre la prevención de la disminución estriatal de GABA con la prevención de la conducta de rotación, ambos considerados parámetros de neurotoxicidad del ácido quinolínico. Cuando dicha relación es establecida entre ambos parámetros por la administración de dosis crecientes de los fármacos empleados por separado, el grado de asociación porcentual entre dichos eventos es parcial; sin embargo, la coadministración de los fármacos produce un grado de asociación total, a dosis que por separado no presentan dicho efecto. Por lo anterior, se puede postular que, en el caso de las asociaciones porcentuales parciales observadas por la administración independiente de los fármacos, el antagonismo inducido sobre los receptores para NMDA podría tener como una consecuencia específica, la preservación de los niveles de GABA; sin embargo, la falta de asociación con el criterio conductual indica que esta protección no es suficiente por sí sola para prevenir un proceso de toxicidad más generalizado, evidenciado por la conducta de rotación, aspecto que involucra la alteración de la vía nigro-estriatal y que puede ser explicado a su vez por un posible efecto tóxico del quinolinato sobre sistemas de transmisión colinérgicos. De hecho, la disminución en el contenido de GABA representa únicamente uno de los dos aspectos postulados como factores involucrados en la toxicidad del ácido quinolínico: la falta de inhibición en el Sistema Nervioso. En consecuencia, el exceso de excitación en el S.N.C. bien podría ser la clave para la falta de asociación entre los parámetros, por la alteración paralela de

otros procesos.

En estos términos, la coadministración de los fármacos parece ser la estrategia adecuada para la prevención total de la neurotoxicidad inducida por el ácido quinolínico por el bloqueo completo de los eventos de excitotoxicidad, siendo efectiva en la prevención de ambos parámetros evaluados, involucrando la protección generalizada del S.N.C.

Por otra parte, el pretratamiento con dizocilpina previno completamente la toxicidad del quinolinato, de acuerdo con reportes previos en la literatura (Foster et al., 1987; Giordano et al., 1990). El mecanismo de protección de la dizocilpina contra el daño neuronal inducido por el quinolinato involucra el antagonismo de los receptores para NMDA (Foster et al., 1988; Olney et al., 1989a). En consecuencia, es factible pensar que los efectos protectores contra el ácido quinolínico mediados por la kinurenina y el probenecid observados en el presente trabajo pueden ser producidos por un mecanismo similar al de la dizocilpina.

Una posibilidad adicional para explicar la acción preventiva del probenecid a corto plazo radica en la habilidad de este fármaco de producir la acumulación de ácidos orgánicos dentro del cerebro, modificando sustancialmente su pH. Se ha demostrado recientemente (Traynelis and Cull-Candy, 1990) que pequeños cambios transitorios en las condiciones de acidez del espacio extracelular pueden inhibir fuertemente la función del receptor para NMDA, debido fundamentalmente a la presencia de protones los cuales pueden actuar en diferentes sitios de dichos receptores,

incluyendo aquéllos para los agonistas. Sin embargo, el efecto del probenecid sobre los cambios en el pH inducidos por este mecanismo aún no ha sido demostrado y permanece en especulación.

Este parece ser el primer reporte acerca de la disminución de los aminoácidos glutamato y aspartato inducida por el ácido quinolínico. Se ha demostrado recientemente (Fedele and Foster, 1993) que la inyección intraestriatal de ácido quinolínico produce la liberación de glutamato y aspartato desde la terminal sináptica. Esta evidencia, obtenida a partir de estudios *in vivo* por un sistema de microdiálisis, puede ser el resultado de la activación presináptica de receptores glutamatérgicos tipo NMDA mediada por el quinolinato. De esta manera, la disminución en el contenido estriatal tanto de glutamato como de aspartato, varios días después de la administración aguda de ácido quinolínico puede explicarse como el resultado de una excesiva liberación de dichos neurotransmisores desde las terminales presinápticas del cuerpo estriado, producida a su vez por la activación continua y prolongada de los receptores para NMDA por el quinolinato. De cualquier manera, la participación de los receptores para NMDA en la disminución del contenido de glutamato y aspartato inducida por el ácido quinolínico está fuertemente sugerida por el antagonismo producido por la dizocilpina sobre los efectos inducidos por la toxina en el contenido estriatal de estos aminoácidos. En consecuencia, las disminuciones tanto de glutamato como de aspartato pueden ser consideradas, a partir de estos hallazgos, como un índice confiable de la sobre-excitación de los receptores para NMDA por el ácido quinolínico. Los efectos

producidos por la administración sistémica de las diferentes dosis tanto de kinurenina como de probenecid, resultaron en la recuperación dosis-dependiente del contenido estriatal de estos aminoácidos, reforzando las cualidades preventivas de daño neuronal de los fármacos empleados.

El descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas contra las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la excesiva activación de los receptores glutamatérgicos constituye aún un paradigma de grandes esperanzas. Sin embargo, muy pocos fármacos han sido probados hasta este momento en cuanto a sus posibles aplicaciones terapéuticas. Los efectos potencialmente neurotóxicos de la administración crónica de la dizocilpina ya han sido caracterizados (Olney et al., 1989b), por lo que su posible aplicación bajo criterios preventivos y terapéuticos en enfermedades humanas asociadas a elevadas concentraciones cerebrales de ácido quinolínico (como el complejo SIDA-demencia, por ejemplo) queda descartada.

Aún cuando el probenecid es un fármaco seguro que es empleado comúnmente en el tratamiento de la gota, entre otras aplicaciones (Weiner, 1980), su uso clínico potencial en enfermedades humanas mediadas por aminoácidos excitadores no puede ser así sugerido a raíz de los hallazgos de este trabajo y requiere de estudios más detallados tendientes a la caracterización de sus efectos en el Sistema Nervioso Central.

A P E N D I C E

Generalidades de los receptores para aminoácidos excitadores

Debido, en gran parte, al trabajo de Watkins y Evans (1981) sobre el descubrimiento de nuevos y mejores análogos del glutamato, los receptores ionotrópicos para aminoácidos excitadores fueron divididos, por muchos años, en tres grandes grupos, basados en sus respuestas a tres agonistas relativamente selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA), quisqualato y kainato. Todos ellos son análogos estructurales del glutamato y parecen activar tres poblaciones de receptores bien definidas. La más estudiada de estas tres entidades es el receptor para NMDA, el cual es bloqueado selectivamente por antagonistas orgánicos e inorgánicos. Los receptores para quisqualato (ahora conocidos como receptores AMPA) y kainato difieren considerablemente de los receptores para NMDA en cuanto a su susceptibilidad al efecto de ciertos antagonistas. Dos evidencias de que los receptores a AMPA y a kainato son entidades distintas permitieron hacer esta diferenciación: a) existen casos (por ejemplo, las fibras aferentes primarias C) en los cuales el kainato genera respuestas, pero en donde el ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) es aproximadamente 100 veces menos potente (Agrawal and Evans, 1986); y b) un receptor funcional a kainato que es insensible al AMPA y a quisqualato fue clonado por Hollmann et al., en 1989. Sin embargo aún no existe un antagonista capaz de hacer una clara distinción entre ambos tipos de receptores y las evidencias fisiológicas sugieren que en

muchas áreas cerebrales, ambas entidades actúan de manera similar. Por esta razón, los receptores a AMPA y a kainato son usualmente clasificados juntos y referidos como receptores no-NMDA, sin ser posible hasta el momento determinar cuál de estos receptores regula la transmisión sináptica tipo no-NMDA. Tanto el L-glutamato como el L-aspartato actúan como agonistas en los tres tipos de receptores y sus acciones excitadoras pueden ser atenuadas o parcialmente bloqueadas por antagonistas para dichos receptores. Los aminoácidos excitadores, el ácido quinolínico y la L-cisteína sulfinato, son ambos compuestos endógenos que pueden actuar como neurotransmisores sobre estos receptores en algunas regiones cerebrales (Nicoll et al., 1990).

Con el uso tanto de NMDA como de AMPA o kainato, se ha podido observar, por estudios autorradiográficos de desplazamiento de la unión del [³H]glutamato, que los tres agonistas son capaces de desplazar efectivamente al glutamato marcado (Monaghan et al., 1985; Cotman et al., 1987). Más aún, estudios sobre la fisiología de los distintos tipos de receptores han permitido saber que estos pueden co-existir en la misma célula. Considerando el comportamiento funcional de las vías neuronales que emplean aminoácidos excitadores como neurotransmisores, se puede inferir que los subtipos de receptores pueden presentarse en una misma neurona y que tanto los receptores subtipo NMDA como los no-NMDA pueden contribuir a la respuesta de liberación sináptica de aminoácidos excitadores (Nicoll et al., 1990).

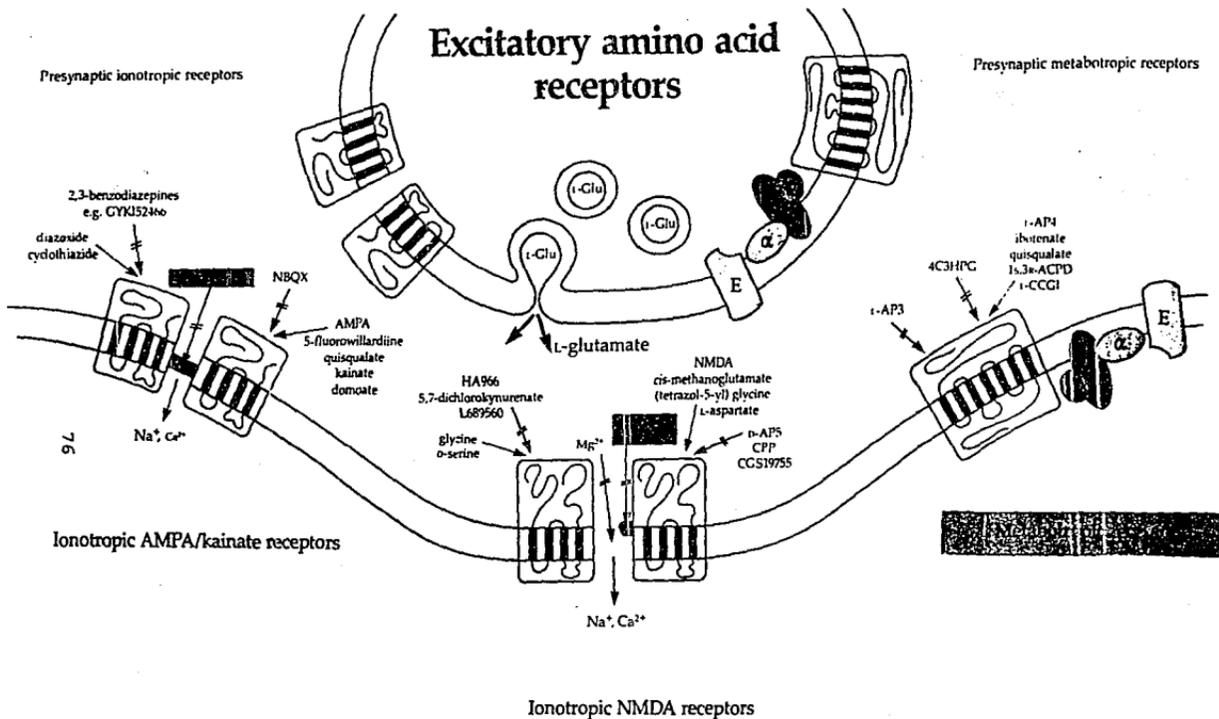


Figura 20. Representación esquemática de los diferentes tipos de receptores para aminoácidos excitadores en el Sistema Nervioso Central. Se muestran los receptores ionotrópicos a AMPA/kainato, ionotrópicos a NMDA y metabotrópicos. Tomado de Lodge D. and Schoepp D. (1993): Receptor Nomenclature Supplement. Elsevier Trends Journals.

Por su parte, los receptores para NMDA, los mejor caracterizados fisiológica y farmacológicamente, están ampliamente distribuidos en el cerebro y la médula espinal de los mamíferos, presentando densidades particularmente altas en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo (Stone, 1993).

Este receptor es un canal iónico activado por ligandos y compuesto de al menos dos diferentes subunidades protéicas conocidas como NMR1 (R_1) y NMR2 (R_2), cada una de las cuales contiene aproximadamente 1,000 residuos de aminoácidos. La subunidad NMR1 puede existir en 7 diferentes isoformas y hay 4 diferentes genes que codifican las variantes de la subunidad NMR2 (NMR2A, NMR2B, NMR2C y NMR2D). Aún no es muy claro cuántas subunidades NMR1 y NMR2 están presentes en cada receptor NMDA funcional (Stone, 1993).

El receptor NMDA tiene múltiples sitios de reconocimiento a ligandos: el L-glutamato y agonistas relacionados se unen y promueven la apertura de un canal de alta conductancia, el cual permite la entrada de calcio y sodio a la célula blanco. Sin embargo, el L-glutamato es virtualmente inefectivo como agonista si el sitio modulador de reconocimiento a la glicina está ocupado. Este sitio de la glicina es distinto al receptor inhibitorio a la glicina sensible a la estriocina encontrado en altas densidades en la médula espinal y el tallo cerebral (Stone, 1993).

La función del receptor para NMDA puede ser también modulada por glutatión, por poliaminas (espermina y espermidina) y por el

pH. En una célula blanco con un potencial de membrana en reposo normal, el L-glutamato es incapaz de activar al receptor para NMDA debido a que el canal iónico está bloqueado por Mg^{2+} , y este bloqueo sólo es removido cuando la célula blanco es parcialmente despolarizada a través de la activación de otras aferencias sinápticas. La naturaleza "condicional" de la función del receptor para NMDA es inusual en comparación con el funcionamiento de otros receptores y permite postular su papel activo en la plasticidad sináptica asociada con el aprendizaje y la memoria (Stone, 1993).

Diferentes mecanismos son utilizados por diferentes antagonistas para la modulación de los receptores para NMDA: los antagonistas competitivos compiten por la unión en el sitio de reconocimiento al L-glutamato (por ejemplo la AP-5, la CPP, etc.); el MK-801 y los antagonistas no competitivos relacionados (como la ketamina y la fenciclidina) actúan ocupando un sitio dentro del canal iónico que es distinto del sitio a Mg^{2+} y su acción es ejercida más efectivamente cuando el receptor está activado, mediante un mecanismo conocido como "bloqueo del canal abierto". Otros antagonistas no competitivos actúan en el sitio de reconocimiento a la glicina (como el (+)-HA-966), o en el sitio de reconocimiento a poliaminas (como el ifenprodil) (Stone, 1993).

Los canales iónico acoplados tanto a receptores para NMDA como a no-NMDA son no selectivamente permeables a cationes monovalentes como el sodio y el potasio, presentando un potencial invertido resultante cercano a los 0 mV para todos los

aminoácidos excitadores probados (Mayer and Westbrook, 1984). En contraste, los canales NMDA y no-NMDA difieren sustancialmente en su permeabilidad a cationes divalentes. Los canales no-NMDA son relativamente impermeables a cationes divalentes, mientras que los canales NMDA son altamente permeables a Ca^{2+} (Mayer and Westbrook, 1987), redundando en una de sus más críticas funciones: el incremento intracelular de calcio necesario para la activación de procesos metabólicos dependientes de segundos mensajeros. Aún cuando los canales asociados a receptores no-NMDA no son muy permeables a calcio, el glutamato y el quisqualato (pero no así el AMPA ni el kainato) actúan sobre los receptores en neuronas hipocámpales en cultivo, causando la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares (Murphy and Miller, 1988), efecto que es mediado por la generación de IP_3 .

Las propiedades fisiológicas de los receptores no-NMDA (AMPA/kainato) parecen relacionadas a la mediación de la transmisión sináptica rápida (milisegundos) en las diferentes vías a través del sistema nervioso central. La respuesta rápidamente desensibilizante tanto al L-glutamato exógeno como al sináptico, es reducida por ciclotiazida y diazoxida, dos agonistas de estos receptores. Otros agonistas más conocidos son el AMPA, el quisqualato, el kainato, el domoato y la 5-fluorowillardiina, mientras que sus antagonistas más importantes son el NBQX, la filantotoxina y las 2,3-benzodiazepinas. Hay al menos 9 variantes de estos receptores, siete de las cuales son conocidas como glur1, glur2, glur3, glur4, glur5, glur6 y glur7. Las dos restantes parecen ser selectivamente sensibles a kainato

y son conocidas como ka1 y ka2. Aunque los agonistas de estos receptores, el kainato y su análogo, el domoato, son potentes convulsivantes y neurotoxinas, se ha demostrado que el AMPA es un agente con cualidades neuroprotectoras en modelos animales de isquemia cerebral (Lodge and Schoepp, 1993).

Aún no existe evidencia definitiva de un posible papel fisiológico de los receptores ionotrópicos para aminoácidos excitadores como autoreceptores presinápticos. Sin embargo, los receptores sensibles a kainato parecen incrementar la liberación de glutamato y están presentes en fibras aferentes primarias (Lodge and Schoepp, 1993).

Con respecto a las propiedades fisiológicas de los receptores para NMDA, éstos son canales de Ca^{2+} unidos a receptores que también regulan la transmisión sináptica rápida (10 ms). La entrada de calcio produce la activación de múltiples sistemas de segundos mensajeros, incluyendo la fosfolipasa C, la óxido nítrico sintetasa, la proteína cinasa C, proteasas, lipasas, fosfatasa, la cinasa II dependiente de calmodulina y las conductancias para K^+ y Cl^- dependientes de calcio (Lodge and Schoepp, 1993). El bloqueo voltaje-dependiente de estos canales por Mg^{2+} resulta en corrientes reducidas en los potenciales hiperpolarizantes de membrana. La regulación de la potenciación (LTP) y de la depresión (LTD) a largo plazo, la modulación de las formas de plasticidad neuronal como el aprendizaje y la memoria, las convulsiones y la degeneraciones aguda y crónica, son algunos de los efectos funcionales de estos receptores. También se encuentran involucrados en muchas otras funciones específicas

como la nocicepción, la función motora y la homeostasis cardiovascular. Sus agonistas más conocidos son el NMDA, el quinolinato, el L-aspartato y la glicina, mientras que sus antagonistas más comunes son la dizocilpina, el kinurenato, el magnesio, el zinc, la fenciclidina (PCP), el ácido fosfonovalérico (APV) y el ácido fosfonoheptanoico (APH) (Lodge and Schoepp, 1993).

Por su parte, se conocen 6 isoformas de los receptores metabotrópicos para aminoácidos excitadores (desde el mglur1 hasta el mglur6), las cuales tienen efectos en la facilitación de procesos mediados por segundos mensajeros, activando las fosfolipasas C, D y A₂, disminuyendo la actividad de la adenilato ciclasa y de los canales potasio y de calcio tipo N dependientes de voltaje e incrementando la actividad de los canales acoplados a receptores tipo NMDA y AMPA y de los canales de potasio y cloro dependientes de calcio. Son también responsables de la modulación sináptica prolongada (100 ms), incrementan la LTP y la LTD y disminuyen las amplitudes de los EPSP (potenciales excitatorios postsinápticos) y de los IPSP (potenciales inhibitorios postsinápticos). Dentro de sus efectos funcionales se considera que juegan un papel central en el control de la información nociceptiva, la regulación cardiovascular, la función motora extrapiramidal, las convulsiones y la degeneración neuronal. Sus principales agonistas son el quisqualato, el ibotenato y el L-2-amino-4-fosfonopropanoato (L-AP4), mientras que el L-AP3 parece desempeñar un papel de antagonista sobre dichos receptores (Lodge and Schoepp, 1993).

La activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos presinápticos a través de una proteína G, disminuye la actividad de canales de Ca^{2+} tipo N, así como la liberación de glutamato y de GABA, en lo que constituye un posible modo de acción para los efectos presinápticos de la L-AP4. Sin embargo, se ha reportado también que en presencia de ácido araquidónico, la estimulación mediada por receptores glutamatérgicos metabotrópicos presinápticos sobre la vía de segundos mensajeros IP_3 /diacilglicerol, incrementa la liberación de L-glutamato (Lodge and Schoepp, 1993).

La relevancia biológica de los receptores para aminoácidos excitadores debe ser considerada en función de su papel en la transmisión sináptica. Los múltiples mecanismos de que estos receptores se valen para su modulación, así como las interacciones entre ellos, dan la pauta para su estudio desde una perspectiva más integrativa, en la cual, el papel de los receptores a otras moléculas neuroactivas y su interrelación con éstos pueden proporcionar, en un futuro no muy lejano, un conocimiento más general del funcionamiento del sistema nervioso central y de las alteraciones a las cuales está vinculada la actividad de dichos receptores (Nicoll et al., 1990).

R E F E R E N C I A S

- Agrawal S.G. and Evans R.H. (1986): The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **87**: 345-355.
- Baran H. and Schwacz R. (1990): Presence of 3-hydroxyanthranilic acid in rat tissues and evidence for its production from anthranilic acid in the brain. *J. Neurochem.*, **55**: 738-744.
- Beal M.F., Kowall N.W., Ellison D.W., Mazurek M.F., Swartz K.J. and Martin J.B. (1986): Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, **321**: 168-171.
- Beal M.F., Kowall N.W., Swartz K.J., Ferrante R.J. and Martin J.B. (1988): Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J. Neurosci.*, **8**: 3901-3908.
- Bender D.A. (1989): The kynurenine pathway of tryptophan metabolism. In Stone T.W. (Ed.), *Quinolinic acid and the kynurenes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 3-38.
- Beyer K.H., Russo H.F., Tillson E.K., Miller A.K., Verwey W.F. and Gass S.R. (1951): Benemid, p-(di-n-propylsulfamyl)-benzoic acid: its renal affinity and its elimination. *Am. J. Physiol.*, **166**: 625-640.
- Block F., Kunkel M. and Schwarz M. (1993): Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci. Lett.*, **149**: 126-128.
- Bondy S.C. (1989): Intracellular calcium and neurotoxic events. *Neurotoxicol. Teratol.*, **11**: 527-531.
- Bruyn R.P.M. and Stoof J.C. (1990): The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.*, **95**: 29-38.
- Carlà V., Lombardi G., Beni M., Russi P., Moneti G. and Moroni F. (1988): Identification and measurement of kynurenic acid in the rat brain and in other organs. *Anal. Biochem.*, **169**: 89-94.
- Carpeneo R., Chiarugi A., Russi P., Lombardi G., Carlà V., Pellicciari R., Mattoli L. and Moroni F. (1994): Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neurosci.*, **61**: 237-244.
- Clifford D.B., Olney J.W., Benz A.M., Fuller T.A. and Zorumski Ch.F. (1990): Ketamine, phencyclidine and MK-801 protect against kainic acid-induced seizures-related brain damage. *Epilepsia*, **31**: 382-390.
- Connick J.H., Heywood G.C., Sills G.J., Thompson G.G., Brodie M.J. and Stone T.W. (1992): Nicotinylalanine increases cerebral kynurenic acid content and has anticonvulsant activity. *Gen. Pharmacol.*, **23**: 235-239.
- Cook J.S. and Pogson C.I. (1983): Tryptophan and glucose metabolism in rat liver cells: the effects of DL-6-chlorotryptophan, 4-chloro-3-hydroxyanthranilic acid and pyrazinamide. *Biochem. J.*, **214**: 511-516.
- Cotman C.W., Monaghan D.T., Ottersen O.P. and Storm-Mathisen J. (1987): Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.*, **10**: 273-280.

- Coyle J.T. and Puttfarcken P. (1993): Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262: 689-695.
- Cheung J.Y., Monventre J.V., Malis D.Ch. and Leaf A. (1986): Calcium and ischemic injury. *New Eng. J. Med.*, 314: 1670-1676.
- Choi D.W. (1988): Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS*, 11: 465-469.
- Danysz W., Fadda E., Wroblewski J.T. and Costa E. (1989): Kynurenate and 2APV interact with multiple binding sites of the NMDA receptor domain. *Neurosci. Lett.*, 96: 340-344.
- Diamond H.S. (1978): Uricosuric drugs. In Kelley W.N. and Weiner I.M. (Eds.), *Uric acid*. Springer-Verlag, Berlin, pp 459-484.
- Du F., Okuno E., Whetsell W.O. Jr., Kohler C. and Schwarcz R. (1991): Immunohistochemical localization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase in the human neostriatum. *Neurosci.*, 42: 397-406.
- During M.J., Heyes M.P., Freese A., Markey S.P., Martin J.B. and 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.
- El-Sewedy S.M. (1989): Pharmacology of the kynurenine pathway. In Stone T.W. (Ed.), *Quinolinic acid and kynurenes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 101-112.
- Ellinger A. (1904): Die entstehung der kyrunensaure. *Z. Physiol. Chem.*, 43: 325-337.
- Fedele E. and Foster A.C. (1993): An evaluation of the role of extracellular amino acids in the delayed neurodegeneration induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neurosci.*, 52: 911-917.
- Ferrante R.J., Kowall N.W., Cipolloni P.B., Storey E. and Beal M.F. (1993): Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp. Neurol.*, 119: 46-71.
- Fleury M.O. and Ashley D.V. (1983): High performance liquid chromatography analysis of amino acids in physiological fluids: on line precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Biochem.*, 133: 330-335.
- Foster A.C., Collins J.F. and Schwarcz R. (1983): On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacol.*, 22: 1331-1342.
- Foster A.C., Vezzani A., French E.D. and Schwarcz R. (1984): Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.*, 48: 273-278.
- Foster A.C., Gill R. and Woodruff G.N. (1987): MK-801 prevents degeneration of striatal neurones caused by intrastriatal injection of quinolinic acid. *Br. J. Pharmacol. Proc. Suppl.*, 90: 7P.
- Foster A.C., Gill R. and Woodruff G.N. (1988): Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed

- degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, 8: 4745-4754.
- Freitas L.F. and Bridges R.S. (1992): Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. *Brain Res.*, 573: 133-138.
- Fukui S., Schwarcz R., Rapoport S.I., Takada Y. and Smith Q.R. (1991): Blood-brain barrier transport of kynurenes: implications for brain synthesis and metabolism. *J. Neurochem.*, 56: 2007-2017.
- Gal E.M. and Sherman A.D. (1980): L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem. Res.*, 5: 223-239.
- Galinsky R.E., Flaharty K.K., Hoestery B.L. and Anderson B.D. (1991): Probenecid enhances central nervous system uptake of 2',3'-dideoxyinosine by inhibiting cerebrospinal fluid efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 972-978.
- Giordano M., Ford L.M., Brauckmann J.L., Norman A.B. and Sanberg P.R. (1990): MK801 prevents quinolinic acid-induced behavioral deficits and neurotoxicity in the striatum. *Brain Res. Bull.*, 24: 313-319.
- Gramsbergen J.B.P., Schmidt W., Turski W.A. and Schwarcz R. (1992): Age related changes in kynurenic acid production in rat brain. *Brain Res.*, 588: 1-5.
- Guarino A.M. and Schanker L.S. (1968): Biliary excretion of probenecid and its glucuronide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 164: 387-395.
- Gutteridge M.C. and Halliwell B. (1990): The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*, 15: 129-134.
- Gutman A.B. (1966): Uricosuric drugs, with special reference to probenecid and sulfinpyrazone. *Adv. Pharmacol.*, 4: 91-142.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1985): *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hantraye P., Richie D., Maziere M. and Isacson O. (1990): A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp. Neurol.*, 108: 91-104.
- Heyes M.P., Mefford I.N., Quearry B.J., Dedhia M. and Lackner A. (1990): Increased ratio of quinolinic acid to kynurenic acid in cerebrospinal fluid of D-retrovirus-infected Rhesus macaques: relationship to clinical and viral status. *Ann. Neurol.*, 27: 666-675.
- Heyes M.P. and Lackner A. (1990): Increased cerebrospinal fluid quinolinic acid, kynurenic acid and L-kynurenine in acute septicemia. *J. Neurochem.*, 55: 338-341.
- Heyes M.P., Saito K., Crowley J.S., Davis L.E., Demitrack M.A., Der M., Dilling L.A., Elia J., Kruesi M.J.P., Lackner A., Larsen S.A., Lee K., Leonard H.L., Markey S.P., Martin A., Milstein S., Mouradian M.M., Pranzatelli M.R., Quearry B.J., Salazar A., Smith M., Strauss S.E., Sunderland T., Swedo S.W. and Tourtellotte W.W. (1992): Quinolinic acid and kynurenine pathway

- metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain*, 115: 1249-1273.
- Higuchi K. and Hayaishi O. (1967): Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.*, 120: 397-403.
- Hirata F. and Hayaishi O. (1971): Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J. Biol. Chem.*, 246: 7825-7826.
- Hollmann M., O'shea-Greenfield A., Rogers S.W. and Heinemann S. (1989): Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature Lond.*, 342: 643-648.
- Israeli Z.H., Perel J.M., Cunningham R.F., Dayton P.G., Yü T.F., Gutman A.B., Long K.R., Long R.C. Jr. and Goldstein J.H. (1972): Metabolites of probenecid. Chemical, physical and pharmacological studies. *J. Med. Chem.*, 15: 709-716.
- Kalikin L. and Calvo K.C. (1988): Inhibition of QPRT by pyridine analogs of quinolinic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152: 550-564.
- Kemp J.A., Foster A.C. and Wong E.H. (1987): Non-competitive antagonist of excitatory amino acid receptors. *TINS*, 10: 294-298.
- Kenwright S. and Levi A.J. (1973): Impairment of hepatic uptake of rifamycin antibiotics by probenecid and its therapeutic implications. *Lancet*, 2: 1401-1405.
- Komulainen H. and Bondy C.S. (1987): Increased free intrasynaptosomal Ca^{2+} by neurotoxic organometals: distinctive mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 88: 77-86.
- Kravzov J., Santamaría A., Ríos C., Flores A. and Altagracia M. (1993): Protective effect of probenecid on circling behavior of rats with unilateral quinolinic acid-induced striatal lesions. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 36: 255-257.
- Lekieffre D., Plotkine M., Allix M. and Boulu R.G. (1990): Kynurenic acid antagonizes hippocampal quinolinic acid neurotoxicity: behavioral and histological evaluation. *Neurosci. Lett.*, 120: 31-33.
- Lodge D. and Schoepp D. (1993): **Excitatory amino acid receptors.** Receptor Nomenclature Supplement. Elsevier Science Publishers, U.K.
- Lombardi G., Carlà V., Moneti G. and Moroni F. (1983): Developmental changes of the content and synthesis of quinolinic acid in the rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 53: Suppl. 24.
- Long C.L., Hill H.N., Weinstock I.M. and Henderson L.M. (1954): Studies of the enzymatic transformation of 3-hydroxyanthranilate to quinolinate. *J. Biol. Chem.*, 211: 405-417.
- Mayer M.L. and Westbrook G.L. (1984): Mixed-agonist action of excitatory amino acids on mouse spinal cord neurones under voltage clamp. *J. Physiol. Lond.*, 354: 29-53.
- Mayer M.L. and Westbrook G.L. (1987): Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse central neurones. *J. Physiol. Lond.*, 394: 501-527.
- McDonough P.M. and Button D.C. (1989): Measurement of cytoplasmic calcium: concentration in cell suspensions: correction for

- extracellular Fura-2 through use of Mn^{2+} and probenecid. *Cell Calcium*, 10: 171-180.
- Miller J.M., MacGarvey U. and Beal M.F. (1992): The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations. *Neurosci. Lett.*, 146: 115-118.
- Monaghan D.T. and Cotman C.W. (1985): Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H] glutamate-binding sites in rat brain. *J. Neurosci.*, 5: 2909-2919.
- Moroni F., Lombardi G., Carlà V. and Moneti G. (1984a): The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res.*, 285: 352-355.
- Moroni F., Lombardi G., Moneti G. and Aldinio C. (1984b): The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content increases during the ageing process. *Neurosci. Lett.*, 47: 51-55.
- Moroni F., Lombardi G., Carlà V., Pellegrini D., Carassale G.L. and Cortesini C. (1986): Content of quinolinic acid and of other tryptophan metabolites increases in brain regions of rats used as experimental models of hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.*, 46: 869-874.
- Moroni F., Russi P., Lombardi G., Beni M. and Carlà V. (1988): Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *J. Neurochem.*, 51: 177-180.
- Mostafa M.H., El-Sewedy S.M., El-Bassiouni E.A. and Abdel-Tawab G.A. (1982): In vivo and in vitro studies on the effects of some phenothiazines and sulpride on kynurenine metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 31: 2227-2230.
- Murphy S.N. and Miller R.J. (1988): A glutamate receptor regulates Ca^{2+} mobilization in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8737-8741.
- Nicoll R.A., Malenka R.C. and Kauer J.A. (1990): Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, 70: 513-566.
- Norman A.B., Ford L.M., Kolmonpunporn M. and Sanberg P.R. (1990a): Chronic treatment with MK-801 increases the quinolinic acid-induced loss of D-1 dopamine receptors in rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.*, 176: 363-366.
- Norman A.B., Wyatt L.M., Hildebrand J.P., Kolmonpunporn M., Moody C.A., Lehman M.N. and Sanberg P.R. (1990b): Sensitization of rotation behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine or kainic acid-induced striatal lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 37: 755-759.
- Ogawa T., Matson W.R., Beal M.F., Myers R.H., Bird E.D., Milbury P. and Saso S. (1992): Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurol.*, 42: 1702-1706.
- Okuno E. and Schwarcz R. (1985): Purification of quinolinic acid phosphoribosyl-transferase from rat liver and brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 841: 112-119.
- Olney J.W., Ikonomidou C., Mosinger J.L. and Friedrich G. (1989a): MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain. *J. Neurosci.*, 9: 1701-1704.

- Olney J.W., Labruyere J. and Price M.T. (1989b): Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science*, **244**: 1360-1362.
- Paxinos G. and Watson G. (1984): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, U.S.A.
- Ríos C. and Santamaría A. (1991): Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.*, **16**: 1139-1143.
- Rothman S.M. and Olney J.W. (1987): Excitotoxicity and the NMDA receptor. *TINS*, **10**: 299-302.
- Russi P., Carlà V., and Moroni F. (1989): Indolpyruvic acid administration increases the brain content of kynurenic acid. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 2405-2409.
- Russi P., Alesiani M., Lombardi G., Davolio P., Pellicciari R. and Moroni F. (1992): Nicotinylalanine increases the formation of kynurenic acid in the brain and antagonizes convulsions. *J. Neurochem.*, **59**: 2076-2080.
- Salter M. and Pogson C.I. (1985): The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. *Biochem. J.*, **229**: 499-504.
- Sanberg P.R., Calderon S.F., Giordano M., Tew J.M. and Norman A.B. (1989): The quinolinic acid model of Huntington's disease: locomotor abnormalities. *Exp. Neurol.*, **105**: 45-53.
- Santamaría A. and 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., Altagracia M., Solís F., Kravzov J., Ordaz H., González L. and Ríos C. (1994): Kynurenine and probenecid prevent quinolinic acid-induced neurotoxicity in rat corpus striatum. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **37**: 29-30.
- Schwarcz R., Whetsell W.O. Jr. and Mangano R.M. (1983): Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, **219**: 316-318.
- Schwarcz R., Foster A.C., French E.D., Whetsell Jr. W.O. and Köhler C. (1984): Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.*, **35**: 19-32.
- Schwarcz R. and Meldrum B. (1985): Excitatory aminoacid antagonists provide a therapeutic approach to neurological disorders. *The Lancet (occasional survey)*, **20**: 140-144.
- Schwarcz R., Okuno E., White R.J., Bird E.D. and Whetsell W.O. Jr. (1988): 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 4079-4081.
- Shoulson I. (1984): Huntington's disease: a decade of progress. *Neurol. Clin.*, **2**: 515-526.
- Siegel S. (1980): *Non parametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Book Company, New York, U.S.A.
- Smith R.J. and Panico K.A. (1985): Automated analysis of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, **8**: 1783-1795.

- Spector R. and Lorenzo A.V. (1974): The effects of salicylate and probenecid on the cerebrospinal fluid transport of penicillin, aminosalicyclic acid and iodide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 188: 55-65.
- Sourkes T.L. (1971): Effects of amino acid derivatives and drugs on the metabolism of tryptophan. *Am. J. Clin. Nutr.*, 24: 815-820.
- Steel R.G.D. and Torrie J.H. (1980): Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Inc., U.S.A.
- Stone T.W. and Connick J.H. (1985): Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neurosci.* 15: 597-617.
- Stone T.W. (1993): Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.*, 45: 309-379.
- Susel Z., Engber T.M. and Chase T.N. (1989): Behavioral evaluation of the anti-excitotoxic properties of MK-801: Comparison with neurochemical measurements. *Neurosci. Lett.*, 104: 125-129.
- Swartz K.J., During M.J., Freese A. and Beal M.F. (1990): Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *J. Neurosci.*, 10: 2965-2973.
- Taylor C.P. and Vartanian M.G. (1992): Probenecid pretreatment enhances anticonvulsant action of NBQX in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 213: 151-153.
- Traynelis S.F. and Cull-Candy S.G. (1990): Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*, 345: 347-350.
- Turski W.A., Gramsbergen J.B.P., Traitler H. and Schwarcz R. (1989): Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine. *J. Neurochem.*, 52: 1629-1636.
- van der Heyden J.A.M. and Korf J. (1978): Regional levels of GABA in the brain: rapid semiautomated assay and prevention of postmortem increase by 3-mercapto-propionic acid. *J. Neurochem.*, 31: 197-203.
- van der Poel F.W., van Praag H.M. and Korf J. (1977): Evidence for a probenecid-sensitive transport system of acid monoamine metabolites from the spinal subarachnoid space. *Psychopharmacol.*, 52: 35-40.
- Vécsei L. and Beal M.F. (1990): Intracerebroventricular injection of kynurenic acid, but not kynurenine, induces ataxia and stereotyped behavior in rats. *Brain Res. Bull.*, 25: 623-627.
- Vécsei L., Miller J.M., MacGarvey U. and Beal M.F. (1992a): Effects of kynurenine and probenecid on plasma and brain tissue concentrations of kynurenic acid. *Neurodegeneration*, 1: 17-26.
- Vécsei L., Miller J., MacGarvey U. and Beal M.F. (1992b): Kynurenine and probenecid inhibit pentylenetetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain. *Brain Res. Bull.*, 28: 233-238.
- Vender, A.D. (1975): The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. In John Wiley and Sons (Eds.), *Amino acid metabolism*, John Wiley and Sons, U.S.A. pp 172-177.

- Vezzani A., Wu H.Q., Angelico P., Stasi M.A. and Samanin R. (1988): Quinolinic acid-induced seizures, but not nerve cell death, are associated with extracellular Ca^{2+} decrease assessed in the hippocampus by brain dialysis. *Brain Res.*, 454: 289-297.
- Vezzani A., Serafini R., Stasi M.A., Caccia S., Conti I., Tridico R.V. and Samanin R. (1989): Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 249: 278-283.
- Vezzani A., Gramsbergen J.B.P., Speciale C. and Schwarcz R. (1991): Production of quinolinic acid and kynurenic acid by human glioma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 294: 691-695.
- Watkins J.C. and Evans R.H. (1981): Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21: 165-204.
- Weiner I.M., Blanchard K.C. and Mudge G.H. (1964): Factors influencing renal excretion of foreign organic acids. *Am. J. Physiol.*, 207: 953-963.
- Weiner I.M. (1990): Inhibitors of tubular transport of organic compounds. In Goodman and Gilman (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press, U.S.A., pp 743-748.
- Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Foster A.C., Whetsell W.O. Jr. and Schwarcz R. (1984): Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.*, 41: 247-252.