

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE EL Fe III 5,10,15,20-Tetrakis
(pentafluorofenil) 21-H, 23-H, Porfirinato, SOBRE LA NEUROTOXICIDAD
INDUCIDA POR EL ÁC. QUINOLÍNICO *In vivo*: POSIBLE PARTICIPACIÓN
DEL PEROXINITRITO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A:
SANTIAGO LÓPEZ ALFONSO DARÍO

DIRECTOR DE TESIS DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

MÉXICO, D. F.



2005

COORDINACIÓN

m-339902



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

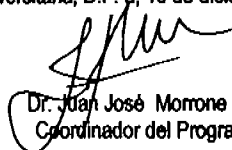
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Santiago López Alfonso Darío con número de cuenta 94565326, con la tesis titulada: "Caracterización del efecto de el Fe III 5,10,15,20 tetrakis (pentafluorofenil) 21-H, 23-H porfirinato, sobre la neurotoxicidad inducida por el ác. Quinolínico in vivo: Posible participación del peroxinitrito", bajo la dirección del(a) Dr. Abel Santamaría del Ángel.

Presidente:	Dr. José Pedraza Chaverri
Vocal:	Dra. María Sítges Berrondo
Secretario:	Dr. Abel Santamaría del Ángel
Suplente:	M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo
Suplente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 10 de diciembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Santiago López Alfonso D.

FECHA: 11 de Noviembre 2004

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

EXPRESO MI AGRADECIMIENTO AL APOYO RECIBIDO A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Este trabajo fue apoyado parcialmente por donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico # IN227103 y IX203504 de la UNAM.

DEDICATORIAS

A MI FAMILIA, POR SU PACIENCIA, APOYO INCONDICIONAL Y COMPRENSIÓN (a la nanita, ron santiago, pipo, burru, chavito y familia, moy y familia, la escuincla, lolus)

AL TAMITO POR SU OPORTUNA INTERVENCIÓN.

A BETY (COMO SIEMPRE) GRACIAS POR TODO.

A MIS AMIGOS:

*DRA. PATY Y FAMILIA, MAESTRA CARMEN Y FAMILIA, PROFESORA ISAUORA,
DRA. SELVA, A LOS DEL POLI (PRIMERA CARRERA), A LOS DE LA UNAM (SEGUNDA
CARRERA), AL BUEN JULIO (CAMARADA), A LA DRA. FANTUL, A LOS DE NEURO, A LA DRA.
MARTHA AL DR. J. ANTONIO, A TODOS ELLOS POR SU APOYO TOTAL ¡MUCHAS GRACIAS!*

*TAMBIÉN QUIERO EXPRESAR MI AGRADECIMIENTO A LA DRA. SITGES POR SU APOYO Y
COMPRENSIÓN.*

CS INDICE 80

RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	
1.0. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD)	3
1.1 ANTECEDENTES ANATÓMICOS.....	3
1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS.....	5
1.3 MODELOS EXPERIMENTALES FARMACOLÓGICOS DE HD.....	6
2.0 ÁCIDO QUINOLÍNICO (QUIN). (GENERALIDADES)	9
2.1 QUIN Y REPRODUCCION DE LA ENFERMEDAD.....	9
2.2 QUIN Y ASOCIACIÓN A PATOLOGÍAS HUMANAS.....	10
2.3 QUIN Y DESTRUCCIÓN NEURONAL.....	11
2.4.QUIN Y RECEPTORES NMDA	12
2.5 ESQUEMA DE EVENTOS NEUROTÓXICOS DEL QUIN	12
3.0 OXIDO NÍTRICO	13
3.1 FORMACION.....	13
3.2 ISOFORMAS DE NOS.....	15
3.3. DISTRIBUCION.....	16
4.0 PEROXINITRITO	17
4.1 FORMACION <i>IN VIVO</i>	17
4.2 TOXICIDAD.....	18
5.0 METALOPORFIRINAS	21
6.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
II. HIPÓTESIS	23

III. OBJETIVOS.....	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. REACTIVOS Y ANIMALES.....	25
2. TÉCNICAS.....	26
• PRETRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	27
• MEDICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS	27
• MEDICIÓN DE LA CONDUCTA DE ROTACIÓN	28
• MEDICIÓN DE LOS NIVELES ESTRIATALES DE GABA	28
• MEDICIÓN DE LA 3-NITROTIROSINA (3-NT)	29
V. RESULTADOS.....	31
• EFECTO DEL FeTPPyP SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA EN EL ESTRIADO POR QUIN.....	31
• EFECTO DEL FeTPPyP SOBRE LA DISMINUCIÓN EN EL CONTENIDO ESTRIATAL DE GABA INDUCIDA POR QUIN.....	32
•	
• EFECTO DEL FeTPPyP SOBRE LA CONDUCTA DE ROTACIÓN INDUCIDA POR QUIN.....	33
• EFECTO DEL FeTPPyP SOBRE LA FORMACIÓN ESTRIATAL DE 3-NITROTIROSINA (3-NT) INDUCIDA POR QUIN.....	34
VI. DISCUSIÓN.....	36
VII. CONCLUSIONES.....	40
VIII. ANEXO A..(ANTECEDENTES HISTORICOS Y ASPECTOS CLÍNICOS DE HD)...	41
IX. ANEXO B.(ESTRES OXIDATIVO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES).....	47
X. BIBLIOGRAFÍA.....	59

RESUMEN

Entre los padecimientos neurodegenerativos que involucran daño oxidativo por formación de radicales libres se encuentra la enfermedad de Huntington (HD), padecimiento autosómico dominante que afecta a la población usualmente en la vida media (cuarta o quinta década de vida y progresión de entre 10 y 15 años), con una sintomatología progresiva de incapacidad física y mental. La HD afecta a hombres y mujeres con la misma frecuencia, y su expresión es de entre 5 a 10 individuos por cada 100,000 en la población mundial.

Se sabe también que el ácido quinolínico (QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptofano en la vía de la kinurenina, un conocido agonista de receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato, y reconocido modelo experimental de HD en roedores, debido a que es una molécula que reproduce experimentalmente las características bioquímicas histopatológicas y conductuales de la enfermedad de Huntington. Por su parte, se ha demostrado la participación activa del óxido nítrico (NO) como factor de daño neuronal en el modelo excitotóxico del QUIN. Sin embargo, el cómo ejerce el NO su contribución al daño evocado por QUIN aún no se ha establecido. Se cree que el NO podría estar actuando directamente como un radical o bien, podría interactuar con el ión superóxido (O_2^-) para generar una molécula más tóxica, el peroxinitrito (ONOO \cdot). Por lo tanto, fármacos capaces de catalizar la descomposición de ONOO \cdot a nitrato, tales como el 5,10,15,20-Tetrakis(Pentafluorofenil) cloruro de hierro (FeTPPyP), constituyen alternativas terapéuticas potenciales para el tratamiento de neuropatías con componentes que involucren al ONOO \cdot .

Con el objeto de dilucidar parte de los mecanismos de daño oxidativo evocados por el QUIN en el sistema nervioso central (SNC) y con la finalidad de aportar más evidencias sobre posibles agentes terapéuticos de naturaleza antioxidante a nivel experimental, en el presente estudio se evaluó el efecto del FeTPPyP sobre diferentes marcadores bioquímicos y moleculares de neurotoxicidad en animales expuestos a una inyección intraestriatal única de QUIN y previamente tratados con FeTPPyP vía sistémica. Entre dichos marcadores están: a) La medición de 3-nitrotirosina (3-NT), como marcador de daño mediante análisis de inmunohistoquímica, para evidenciar la participación del peroxinitrito

derivado del óxido nítrico en el patrón de daño del QUIN; b) Peroxidación lipídica por fluorescencia; c) La cuantificación de los niveles del ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor del SNC, involucrado también en este modelo de HD; d) Análisis de la conducta rotacional, parámetro que integra el daño a nivel periférico.

Entre los resultados obtenidos, se muestra una protección total en los niveles de peroxidación lipídica, provistas por el FeTPPyP e inducidas por el QUIN, este resultado se correlaciona con la tendencia hacia la protección, sobre los niveles de GABA. Pero la evidencia más clara del efecto protector del FeTPPyP, ante el daño por el QUIN, se encuentra en la conducta de rotación debido a que es un parámetro integrativo y global del daño por QUIN donde se involucra la función de los ganglios basales a nivel periférico y que se refleja en la conducta del animal. Esta evaluación permite poner de manifiesto un daño más extenso. En donde se observa, una disminución marcada en la conducta de rotación respecto al daño producido por el QUIN, Finalmente para poner de manifiesto la participación del peroxinitrito y la oportuna intervención por parte del FeTPPyP a nivel celular, se recurrió a la medición de la 3-NT, que es un reconocido marcador de daño y presencia de peroxinitrito, en donde se observan cortes de tejido estriatal contrastadas con hematoxilina, el cerebro de un animal lesionado con QUIN, que revela una marcada reactividad contra 3-NT, y presencia indirecta del ONOO^- , comparadas con la ausencia de reacción en los demás tratamientos.

Estudios previos por parte de nuestro grupo y otros, han sugerido en primera instancia, que la mayoría de los marcadores de neurotoxicidad inducidos por QUIN son mediados por la formación de radicales libres y el estrés oxidativo.

Por lo tanto la evidencia de la disminución de los niveles de peroxinitrito, correlacionada con los parámetros de daño inducida por el QUIN, sugieren un papel de protección potencial en procesos patológicos. Los resultados encontrados en este trabajo proveen una evidencia más de la intervención del ONOO^- en respuestas al estrés oxidativo, ya sea vía formación de especies reactivas del oxígeno o nitrógeno (ROS o RNS) en condiciones *in vivo*, por la intervención directa de un fármaco que actúa para descomponer al peroxinitrito, sin la formación de otras especies reactivas.

I

1.0 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD)

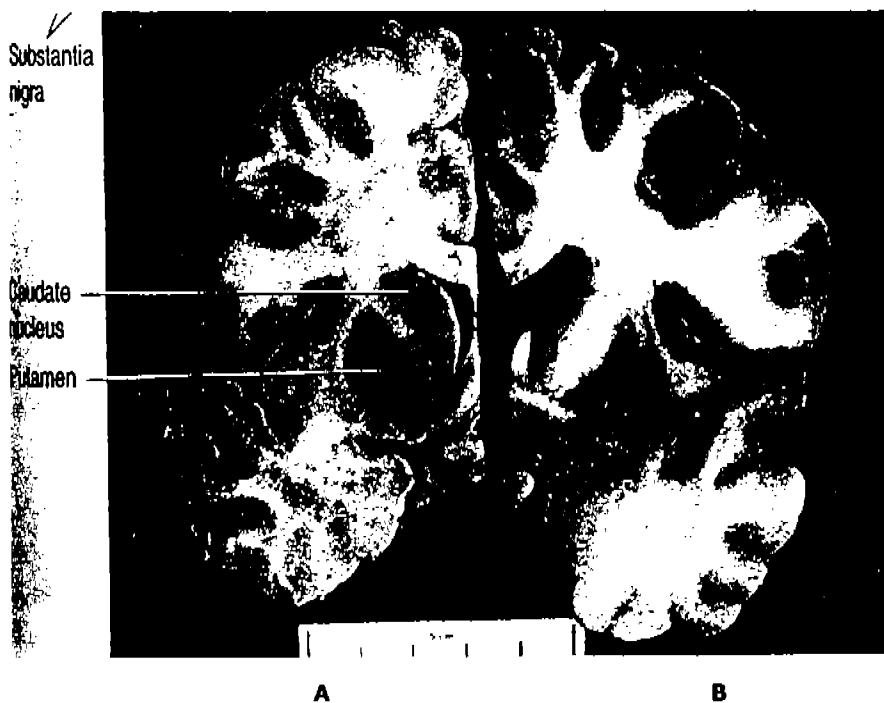
1.1 ASPECTOS ANATÓMICOS DE HD

La HD esta clasificada anatómicamente como un padecimiento del los ganglios basales (ver estriado en anexo), particularmente como una enfermedad propia de las *vías extrapiramidales*; debido a que involucra desde los ganglios basales (caudado, putamen y globo pálido) y hasta la corteza y los nervios periféricos, ocasionando desde movimientos involuntarios o "*corea*", hasta deterioro cognitivo (Liles y Davies, 1969; Lange y cols., 1976).

Las anomalías en el cerebro, de manera general, se caracterizan por destrucción de tejido del núcleo caudado y putamen, así como una atrofia cortical general simétrica, con alargamiento de los ventrículos laterales (Bruyn y cols., 1973; Hayden y cols., 1981; Von Sattel y cols., 1985). La atrofia cortical es generalmente más marcada en la región frontal, pero puede involucrar al cerebro entero en pacientes con enfermedad avanzada. Con la extensa degeneración del cerebro se presenta una marcada reducción del peso cerebral (ver foto), el cual puede ser reducido en 200 g o más (Robert y cols., 1998). Se observa además una extensa pérdida de células en el estriado, especialmente en neuronas pequeñas componentes del núcleo caudado y del putamen; sin embargo, más tarde, tanto las neuronas pequeñas como las largas degeneran (Forno y cols., 1973 y 1979). Se piensa que las neuronas espinosas de tamaño medio presentan mayores anomalías en HD, usualmente con anomalías dendríticas. En estados avanzados de la enfermedad, el globo pálido también muestra una baja neuronal y encogimiento, y la baja neuronal en todos los ganglios basales puede eventualmente ser casi completa. Se nota un incremento, de marcado a moderado, en glía en las áreas afectadas por la pérdida celular. La reacción glial primariamente es astrogliar, pero hay un relativo incremento en las células oligodendrogiales. En la corteza cerebral, las células pequeñas de las capas más profundas predominantemente producen el choque del proceso degenerativo, y aquí

se presenta la mayor gliosis, a comparación de otras áreas. Usualmente hay una disminución en la fibra mielinizada contenida en el estriado, pero pocas fibras desmielinizadas escapan a la destrucción (Robert y cols., 1998).

Otras áreas del cerebro que pueden mostrar pérdida neuronal incluyen núcleos ventrolaterales del tálamo, núcleos subtalámicos, hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal. Diferentes grados de pérdida neuronal son establecidos en estas áreas, junto con gliosis (Robert y cols., 1998).



En la fotografía se muestra la comparación entre el corte cerebral coronal de un cerebro normal (A), y un cerebro con enfermedad de Huntington (B), donde se aprecia el agrandamiento de los ventriculos, debido a la pérdida de tejido.

1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE HD

Las sustancias neurotransmisoras, desde el punto de vista de la función ganglionar basal, son el glutamato, el ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, acetilcolina y la serotonina. La sustancia P y la encefalina desempeñan funciones subsidiarias en las vías del GABA. El glutamato es, probablemente, el neurotransmisor más abundante en las proyecciones corticoestriatales excitatorias y en las neuronas excitatorias del núcleo subtalámico. El GABA es el neurotransmisor (Inhibitorio) de las neuronas estriatales de proyección del globo pálido y de la parte reticulata de sustancia nigra. Las proyecciones nigroestriatales derivadas de neuronas de la parte compacta utilizan dopamina como su neurotransmisor (Kandel y cols., 1991).

Hablando específicamente de la HD, bioquímicamente se observa un deterioro en el metabolismo de la glucosa en núcleo caudado, con lo cual se postula una explicación parcial para los movimientos involuntarios inducidos por L-dopa al inducir un exceso de dopamina (hasta un 70 % en putamen, caudado, globo pálido medio y lateral, núcleo accumbens, y sustancia nigra parte compacta) (Martin, 1984). El déficit neuroquímico incluye GABA, hasta un 60 %, en todas las áreas de los ganglios basales (Incluyendo el núcleo caudado, putamen, globo pálido, y sustancia nigra), sustancia P, colecistoquinina y meta-encefalina (Beal y Mazurek, 1986), así como de otros neurotransmisores estriatonigrales (Spokes, 1981; Reynolds y Pearson, 1987). La sustancia P es ampliamente reducida en el globo pálido medio, así como la colecistoquinina en globo pálido y sustancia nigra, y la meta-encefalina en el globo pálido medio y lateral, y en ambas áreas de sustancia nigra (Martin, 1984). Entre los desórdenes en el metabolismo de otros neurotransmisores se incluyen un incremento de norepinefrina en esta misma área, con una reducción de la glutamato descarboxilasa (GAD, la enzima de síntesis de GABA), y de acetilcolina y de su correspondiente enzima de síntesis, la colina-acetil transferasa (CAT), en cerebros con HD se observa una reducción del 50 % de su actividad por unidad de peso en el putamen y núcleo caudado. Esta última se ve reducida hasta un 50 % (Bird y cols., 1974; Mc Geer y cols., 1973). Enna (1985) demostró que los sitios enlazantes de GABA en neuronas estriatales no disminuyen más allá de lo esperado de acuerdo a la pérdida de células nerviosas, pero esto no ha sido suficiente para que el empleo de

fármacos GABA-like contra la HD tengan éxito. En condiciones normales, los niveles de la enzima colina acetiltransferasa (CAT) son altos en los ganglios basales, particularmente en el putamen. Los niveles de somatostatina y neuropéptido Y están incrementados más de 3 a 5 veces en caudado/putamen y globo pálido, sin cambios en otras áreas del cerebro (Schwarcz y cols., 1983; Schwarcz y cols., 1984; Wolfensberger y cols., 1984). También hay una pérdida del 50 % de receptores muscarínico-colinérgicos en el estriado y globo pálido (Adams y cols., 1999) (Ver tabla 1).

Para una revisión de los aspectos clínicos más detallados del padecimiento ver anexo.

1.3 MODELOS EXPERIMENTALES FARMACOLÓGICOS DE HD

Debido a que la HD reproduce las características bioquímicas específicas mencionadas, se tiene un punto de partida hacia la investigación experimental del mismo. Partiendo de lo anterior, Schwarcz y colaboradores (1983) demostraron que el ácido quinolínic (QUIN) produce lesiones tipo *axon-sparing* (o de axón preservado) similares a las observadas en HD. Esas lesiones ocasionan una disminución de neurotransmisores en neuronas espinosas estriatales, entre los que se encuentra el GABA, pero sin afectar dopamina. Posteriormente se demostró que el estriado de pacientes con HD, a pesar de la disminución de GABA y la destrucción neuronal, registraba un moderado y paradójico incremento tanto de somatostatina como de neuropéptido Y, en principio atribuidos a una preservación selectiva ocasionada básicamente por una subclase de neuronas espinosas estriatales, a la cual estos péptidos se encuentran asociados (Aronin y cols., 1983; Beal y col., 1984; Nemeroff y cols., 1983; Ferrante y cols., 1985; Dawbarn y cols., 1985). Sin embargo Beal y colaboradores (1986) publicaron un estudio que confirmó al QUIN como un excelente modelo de la HD, en donde se resume lo siguiente:

Los siguientes resultados (análisis Inmunohistoquímicos) fueron obtenidos de un estudio comparativo entre diferentes compuestos tóxicos (excitadores), e inductores de daño al sistema nervioso central de la rata, con el objeto de tratar de encontrar un modelo experimental farmacológico de la HD. Compuestos como el ácido kaínico (KA), el ácido iboténico (IA), el N-metil-D-aspartato (NMDA) y el ácido ftálico (PA), fueron todos comparados contra el ácido quinolínic (QUIN) (Beal y col. 1986).

En un primer experimento se le inyectó intraestriatalmente a las ratas el ácido quinolínic a diferentes concentraciones desde 75 hasta 450 nmoles/ μ l. El resultado fue

una gráfica de respuesta dosis-dependiente en donde se aprecia el abatimiento tanto de GABA como de la inmunoreactividad a sustancia P-like, pero sin cambios en la somatostatina y el neuropéptido Y. De estos resultados, la dosis de QUIN que reprodujo el modelo de daño más confiable fue de 240 nmoles/ μ l (Shoulson, 1984).

En un segundo experimento se probaron los otros compuestos, pero incluyendo al QUIN, ya con la dosis óptima encontrada, y para los demás, en concentraciones previamente conocidas para la producción de daño neuronal. Los grupos recibieron ácido nicotínico (240 nmoles/ μ l), ácido ftálico (240 nmoles/ μ l), ácido quinolínico (240 nmoles/ μ l), NMDA (270 nmoles/ μ l), ácido lboténico (130 nmoles/ μ l) y ácido kaínico (10 nmoles/ μ l). Todas las inyecciones fueron intraestriatales. Todos estos fármacos demostraron tener un efecto neurotóxico, pero con diferencias específicas con respecto al QUIN. En la tabla 1 se resumen los hallazgos de diferentes reportes (Shoulson, 1984). El ácido nicotínico fue administrado como control debido a que estructuralmente es similar al QUIN, excepto por el grupo carboxilo en la posición 2 que posee el QUIN en el anillo piridínico. Ocho animales de cada grupo fueron sacrificados después de 3 semanas y analizados como en el primer experimento. La evaluación fue sobre cuerpo estriado (evaluando alteraciones morfológicas y perfiles bioquímicos), mostrando que, para el ácido ftálico y el ácido nicotínico, no hubo alteraciones significativas en la Inmunoreactividad a la somatostatina-like (SLI), al neuropéptido Y-like (NPYLI), a la sustancia P-like, a la vasopresina-like (VLI). Sin embargo, el resto de los agentes empleados redujeron sustancialmente la inmunoreactividad a la sustancia P, a la Ach y al GABA estriatal, tal como ocurre en la HD (Shoulson, 1984).

TABLA 1. PERFILES NEUROQUÍMICOS EN EL CUERPO ESTRIADO DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD) Y DE RATAS LESIONADAS CON ÁCIDO KAÍNICO, ÁCIDO IBOTÉNICO (KA/IA) Y ACIDO QUINOLINICO

Molécula Neuroactiva	pacientes (HD)	ratas (KA/IA)	ratas (QUIN)
GABA/GAD	↓	↓	↓
Acetilcolina/CAT	↓	↓	↓
Sustancia P	↓	↓	↓
Dopamina	=	=	=
Vasopresina	=	=	=
Somatostatina	↑	↓	=
Neuropéptido Y	↑	↓	↓

↓= Disminuye, ↑= Aumenta, = = Sin cambio

Bruyn y Stoof, (1990): *The Quinolinic acid hypothesis in Huntington's Chorea*
 J. Neurol. Sci. 95: 29-38

A diferencia de los otros agentes, el QUIN no alteró la inmunoreactividad de la somatostatina ni del neuropéptido Y, de modo muy semejante a lo que ocurre en la HD, estableciendo así una selectividad fundamental con respecto a los otros agentes excitadores (que sí los afectan), y proporcionando un patrón de toxicidad más específico y reproducible para modelar esta enfermedad en animales. La necrosis y la degeneración celular características de la HD también han sido reproducidas con precisión por el QUIN. De éste estudio (Beal y cols., 1986) se ha profundizado más sobre el QUIN, postulándolo como la excitotoxina capaz de reproducir más fielmente las características bioquímicas, histopatológicas y conductuales de la enfermedad (Schwarcz y cols., 1984; Sanberg y cols., 1989; Bruyn y Stoof, 1990; Hantraye y cols., 1990; Block y cols., 1993). Los efectos tóxicos selectivos conferidos al QUIN son debidos a las características que reproduce cuando se le inyecta *in vivo* al cuerpo estriado de rata y de primates no humanos. Dichos efectos son resumiendo: La disminución estriatal de GABA y Ach así como de la actividad de sus respectivas enzimas de síntesis GAD y CAT, las alteraciones en el movimiento de los animales lesionados, y la destrucción selectiva de neuronas GABAérgicas y colinérgicas estriatales, dando en conjunto, un patrón de similitud notable respecto a las alteraciones

presentadas en pacientes con HD (Bruyn y Stoof, 1990). Más recientemente, tanto el QUIN como la vía metabólica de la kinurenina, han sido implicados en la patogénesis de algunas otras enfermedades neurodegenerativas (Moroni y cols., 1986; Schwarcz y cols., 1988; Stone y Coonick, 1985), infecciosas e inflamatorias (Heyes y cols., 1990a; Heyes y Lackner, 1990b; Heyes y cols., 1992a,b,c). Así mismo, Heyes y colaboradores (1989, 1991) han demostrado que las concentraciones de QUIN están incrementados notablemente en médula espinal de pacientes infectados con VIH. Debido a los grandes niveles que se observan en estos pacientes, se pone en evidencia una correlación entre el QUIN y los síntomas y signos patológicos del complejo SIDA-demencia, confiriéndole a esta neurotoxina también una importancia inmunológica (Stone, 1993).

2.0 ÁCIDO QUINOLÍNICO

2.1 QUIN Y REPRODUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD

2.1.1. GENERALIDADES DEL QUIN

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico (o QUIN) fue identificado por primera vez por Wolfensberger y colaboradores (1984) en tejido cerebral de rata y de humano, y posteriormente en cerebro de ratón, conejo, y otros mamíferos pequeños (Moroni y cols., 1986). En este primer informe (Wolfensberger y cols., 1984) se observó que el QUIN está presente preferencialmente en núcleo caudado, corteza cerebral y corteza frontal cerebral, concordando dichas regiones con lo encontrado en tejido cerebral de ratas. En un segundo informe (Moroni y cols., 1986), se establece que el QUIN está presente en corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral de varios mamíferos, y que su concentración aumenta directamente con la edad, de manera que en los animales "seniles" los niveles de dicha toxina son más altos. Dado que el QUIN puede estar involucrado en algunos de los procesos de envejecimiento celular relacionados con la edad, es probable que sea un factor potencialmente activo en la degeneración neuronal

presentadas en pacientes con HD (Bruyn y Stoof, 1990). Más recientemente, tanto el QUIN como la vía metabólica de la kinurenina, han sido implicados en la patogénesis de algunas otras enfermedades neurodegenerativas (Moroni y cols., 1986; Schwarcz y cols., 1988; Stone y Coonick, 1985), infecciosas e inflamatorias (Heyes y cols., 1990a; Heyes y Lackner, 1990b; Heyes y cols., 1992a,b,c). Así mismo, Heyes y colaboradores (1989, 1991) han demostrado que las concentraciones de QUIN están incrementados notablemente en médula espinal de pacientes infectados con VIH. Debido a los grandes niveles que se observan en estos pacientes, se pone en evidencia una correlación entre el QUIN y los síntomas y signos patológicos del complejo SIDA-demenia, confiriéndole a esta neurotoxina también una importancia inmunológica (Stone, 1993).

2.0 ÁCIDO QUINOLÍNICO

2.1 QUIN Y REPRODUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD

2 .1.1. GENERALIDADES DEL QUIN

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico (o QUIN) fue identificado por primera vez por Wolfensberger y colaboradores (1984) en tejido cerebral de rata y de humano, y posteriormente en cerebro de ratón, conejo, y otros mamíferos pequeños (Moroni y cols., 1986). En este primer informe (Wolfensberger y cols., 1984) se observó que el QUIN está presente preferencialmente en núcleo caudado, corteza cerebral y corteza frontal cerebral, concordando dichas regiones con lo encontrado en tejido cerebral de ratas. En un segundo informe (Moroni y cols., 1986), se establece que el QUIN está presente en corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral de varios mamíferos, y que su concentración aumenta directamente con la edad, de manera que en los animales "seniles" los niveles de dicha toxina son más altos. Dado que el QUIN puede estar involucrado en algunos de los procesos de envejecimiento celular relacionados con la edad, es probable que sea un factor potencialmente activo en la degeneración neuronal

espontánea que ocurre durante los cambios fisiológicos vinculados con la edad. Este hecho es interesante cuando se considera que los efectos tóxicos inducido por este metabolito endógeno sólo se han observado en tejido nervioso maduro (Schwarcz y cols., 1984), lo que refuerza la tendencia a pensar en un posible vínculo entre las alteraciones celulares relacionadas a la edad y la sobreproducción de esta neurotoxina. El incremento observado en el QUIN se observó preferencialmente en cuerpo estriado y corteza cerebral (Moroni y cols., 1986), regiones especialmente susceptibles a la toxicidad de este aminoácido excitotóxico (Beal y cols., 1986; Schwarcz y cols., 1984), a los procesos patológicos encontrados en la HD (Buglani y cols., 1984; Martín y Gusella, 1986; Bruyn, 1966; Gravelord y cols., 1985), y a los procesos generales de envejecimiento (Stadman, 2002), existiendo así múltiples puntos de concordancia.

2.1.2. QUIN Y SU ASOCIACIÓN A PATOLOGÍAS HUMANAS

La vía de la kinurenina y el QUIN, uno de sus productos, juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, y en particular del complejo SIDA/demencia. Debido a la gran cantidad de procesos oxidativos presentes en esta vía de oxidación, la generación de radicales libres durante dicho proceso es considerablemente elevada (Vender, 1975). Bajo condiciones normales, gran parte del triptofano catabolizado sigue la vía hasta formar Acetil-coA. Sólo una pequeña proporción del metabolismo diario del triptofano deriva a otros metabolitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas de constante disposición de triptofano, la excreción de kinurenina y de metabolitos intermedarios como el QUIN se incrementa considerablemente (Vender, 1975).

Se sabe que, en el estriado de rata, el ácido kinurénico bloquea los efectos neurotóxicos del QUIN en el cerebro (Foster y cols., 1984b; Guillemín y cols., 2001). Al QUIN además se le ha asociado con cáncer (Harman, 1993) a través de la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Platenik y col., 2001). Dado que se ha demostrado que el QUIN *per se* induce la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ *in vivo* en cuerpo estriado de rata (Santamaría y cols., 2001b).

El QUIN es sintetizado en microglia y macrófagos en el estriado de rata a través de la 3-hidroxi-antranilato oxigenasa, determinada con alta capacidad y baja afinidad para 3-hidroxi-antranilato; así, los niveles extracelulares de QUIN durante una inflamación neuronal son tan altos que promueven la excitotoxicidad (Lehrmann y cols., 2001; Obrenovitch, 2001). Los astrocitos presentan un papel protector al minimizar la producción de QUIN y maximizando la síntesis de ácido kinurénico; sin embargo, en presencia de macrófagos y/o microglia, los astrocitos se vuelven indirectamente neurotóxicos por la producción de grandes concentraciones de kinurena que puede ser metabolizada secundariamente por monocitos infiltrados o cercanos, quienes formarán QUIN (Gullemin y cols., 2001).

2.1.3 QUIN Y DESTRUCCIÓN NEURONAL

El QUIN como excitotoxina, al ser infundido intraestriatalmente de manera crónica y a bajas concentraciones (4-10 nmol/h) induce una degeneración de células neuronales tiempo-dependiente, con una disminución selectiva de células colinérgicas (Forloni y cols., 1992). La degeneración se observa alrededor del sitio de inyección. Se ha observado un incremento en la actividad de las aferentes dopaminérgicas en las fases aguda y subaguda de la inyección de QUIN, detectándose además un incremento en los niveles locales de norepinefrina luego de 4 y 11 días de la inyección intraestriatal de QUIN, permaneciendo sin cambios en los sitios distantes o en los periodos más cercanos al momento de la microinyección (Mazzari y cols., 1986), así también hay un incremento en la actividad de la enzima QUIN-fosforibosiltransferasa (enzima que degrada al QUIN) en respuesta a los eventos neurodegenerativos (Foster y cols., 1985). Se observa además una reducción dosis-dependiente del contenido estriatal de GABA, luego de una infusión intraestriatal de QUIN (Harris y cols., 1998). La inyección de QUIN en cuerpo estriado no altera los sitios distantes a la inyección. Un incremento agudo en las concentraciones de QUIN conduce a un aumento en la actividad nigroestriatal mediada por estimulación excesiva de neuronas, mientras que los cambios subsecuentes, se deben a las reacciones locales de las terminales nerviosas dopaminérgicas, secundarias a la degeneración neural en el estriado (Foster y cols., 1984a).

2.1.4. QUIN Y RECEPTORES NMDA

Desde hace tiempo se ha establecido que la acción excitotóxica del QUIN en estriado está mediada por los receptores tipo NMDA, y su acción es antagonizada por magnesio y aminofosfonatos. La estimulación del receptor NMDA por QUIN en estriado de rata produce desórdenes metabólicos diversos: reducción del consumo de O₂ mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y NAD, así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon y cols., 1997). Además, reproduce el patrón de la pérdida de células neuronales característica de la HD (Bordelon y cols., 1997; el-Defrawy y cols., 1986). Hay también una reducción de la actividad de la glutatión reductasa, observada en experimentos en ratas, que sugiere una causa o factor de contribución al déficit observado en la disponibilidad del glutatión inducida por QUIN (Aguado y cols., 2000).

2.1.5 ESQUEMA DE EVENTOS NEUROTÓXICOS DEL QUIN

Se ha visto que la peroxidación lipídica inducida por QUIN involucra una selectividad regional y puede ser prevenida parcialmente por antagonistas de receptores para NMDA (Rodríguez-Martínez y cols., 2000; Santamaría y cols., 2001a). Existen evidencias de que el QUIN *per se* induce la formación de radicales ·OH *in vivo* en cuerpo estriado de rata durante los primeros estadios de toxicidad aguda (Santamaría y cols., 2001b); quizá por ello, algunas de las defensas antioxidantes endógenas se han visto modificadas por la administración de la toxina. Mientras que la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD) permanecen sin cambios por efecto del QUIN, la actividad de la SOD dependiente de Cu²⁺/Zn²⁺ (Cu, Zn-SOD) disminuye significativamente, así como ocurre con el sistema antioxidante endógeno conformado por glutatión-reducido:glutatión-oxidado (GSH/GSSG). Se establece, de este modo, la capacidad del QUIN para inducir daño neuronal a través de la formación de radicales libres y el abatimiento de los sistemas antioxidantes endógenos más relevantes (Rodríguez y cols., 2000; Santamaría y cols., 2001a; Santamaría y cols., 2001b)

3.0 OXIDO NITRICO

3.1 ANTECEDENTES

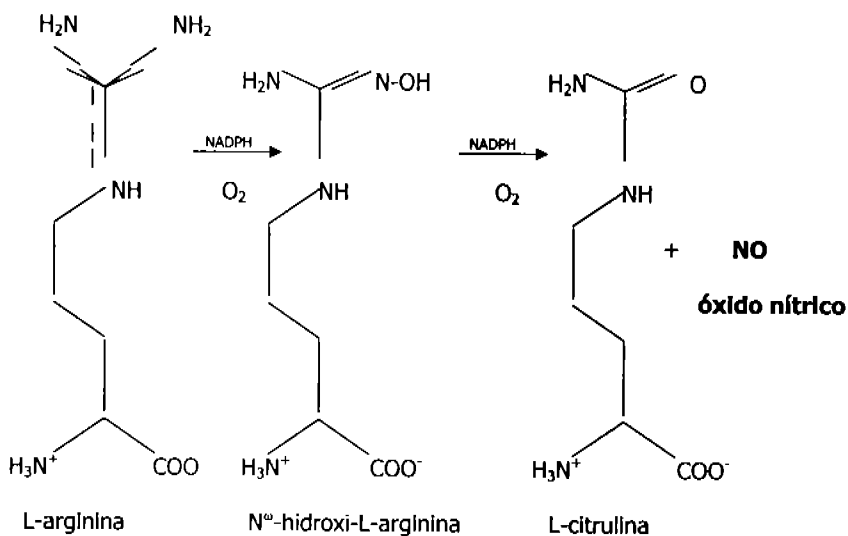
La generación de óxidos de nitrógeno por células de mamíferos fue descrita a principio del siglo XX por Mitchell y colaboradores (revisado por Guzmán J.-Apraku A.1999). Sin embargo, se generó poco interés respecto de su rol en sistemas biológicos y en el ser humano particularmente. 60 años después, se obtuvieron los siguientes descubrimientos de importancia en biología humana. La mayoría de los estudios hechos durante este período se concentraron a la parte relativa de los óxidos de nitrógeno enfocado, hacia las enfermedades pulmonares, como resultado de la exposición a la contaminación ambiental .

A finales de los 70's y principio de los 80's, se descubrió la formación biológica de NO en macrófagos, endotelio y neuronas; también se descubrieron los roles fisiológicos correspondientes a este gas como un modulador de la función inmune, tono vascular y neurotransmisor (Fortesmann y col., 1995a; Moncada y col., 1991; Nathan y Xie , 1994a; Stuehr y Griffith, 1992), respectivamente, abriendo el horizonte de una era nueva para la biología de mamíferos.

3.1.1 FORMACIÓN

La Óxido Nítrico Sintasa (NOS) es una hemoproteína que cataliza la oxidación dependiente de calmodulina de uno de los grupos guanidino terminal de L-arginina, resultando en la formación estequiométrica de L-citrulina y NO (Stuerh y Griffith, 1992). Esta reacción involucra la transferencia de 5 e⁻ del oxígeno molecular (O₂), hacia el Nitrógeno del sustrato guanidino y requiere Nicotinadeninadinnucleótido Fosfato Reducido (NADPH) como cosustrato y Tetrahidrobiopteridina (BH₄), Flavinadeninadinnucleotido (FAD) y FMN como cofactores (Stuerh y Griffith, 1992). La oxidación de L-Arginina ocurre en dos fases: La primer fase involucra la hidroxilación de L-arginina al producto intermediario *N^ω-L-Hidroxiarginina* (OHArg) (Marletta, 1993), de manera parecida a la hidroxilación de la citocromo P-450, consumiendo 1 mol de NADPH y posiblemente involucrando al hierro

hemo de NOS. En la fase II, el OHArg es oxidado a L-citrulina en una reacción dependiente de BH_4 , que consume otra mol de NADPH como agente reductor y libera NO (Marletta, 1993). En ausencia de L-arginina y BH_4 , la activación de O_2 molecular por NOS resulta en una reducción divalente de O_2 y se forma $\cdot O_2^-$ y H_2O_2 (Zwiler y cols. 1988)



Gráfica 2 síntesis de NO

3.1.2 ISOFORMAS DE NOS

Existen 3 Isoformas para la familia de enzimas NOS, cada una codificada en diferentes regiones genéticas (Forstermann y cols. 1995a; Nathan y Xie, 1994b). De acuerdo a su modo de activación éstas pueden ser agrupadas en constitutivas (dependientes de Ca^{2+} -calmodulina), o Inducibles (Independientes de Ca^{2+} -calmodulina). De acuerdo a la siguiente tabla se resumen sus características y nombres:

<i>isoforma</i>	<i>Otros nombres</i>	<i>Características enzimáticas</i>
NOS neuronal	nNOS	150-160 Kda
	bNOS	Citosólica y enlazado a membrana
	cNOS	Expresión constitutiva
	ncNOS	Dependiente de Ca^{2+} -calmodulina
	bcNOS	Baja producción de NO
NOS inducible	NOS 1	Dominio N término PDZ
	NOS I	Célula prototipo: neurona
	iNOS	125-135 Kda
	macNOS	Predominantemente citosólico
	hepNOS	Expresión inducible
NOS endotelial	NOS 2	Independiente de Ca^{2+} -calmodulina
	NOS II	Alta producción de NO Célula prototipo: macrófagos
	eNOS	135 Kda
	cNOS	Enlazado a membrana
	ecNOS	Expresión constitutiva
	NOS 3	Dependiente de Ca^{2+} -calmodulina
	NOS III	Baja producción de NO Célula prototipo : endotelio

Gráfica 3 *ISOZIMAS DE NOS* (Forstermann y cols., 1995^a)

En su estado activo, las tres isoformas son homodímeros de subunidades alineadas de 130 y 160 KDa (Bredt y cols 1991; Xie y cols., 1992), la dimerización activa la síntesis de NO al

permitir la transferencia de electrones entre el dominio reductasa a oxigenasa (Siddhanta y cols., 1996). El grupo hemo y BH_4 contenidos dentro del dominio oxigenasa aparentemente son esenciales para la dimerización enzimática que ocurre (Cho y cols., 1995 ; Klatt y cols. 1996). Interesantemente la L-arginina altera el equilibrio de la enzima hemo del hierro, incrementando la oxidación de NADPH y promoviendo el ensamble de los dímeros activos a partir de los monómeros inactivos y este tipo de comportamiento lleva a pensar que la síntesis de NO probablemente sea por retroalimentación (Sennequier y Stuehr, 1996). Inversamente, el NO parece interferir con el ensamble intracelular de NOS dímérico al evitar la inserción del hemo y disminuir la cantidad de hemo disponible, un efecto que podría representar una inhibición por retroalimentación que limitara la actividad de NOS (Albakri y Stuehr, 1996). Una región se enlaza a Calmodulina (CaM) en todas las isoformas de NOS entre los dominios oxigenasa y reductasa (Anagli y cols 1995; Bredt y cols., 1992). El enlace de CaM a NOS, aparentemente induce un cambio conformacional, que es seguida por un flujo de electrones de NADPH a FAD, FMN y hemo (Marletta, 1993, 1994b y Su, y cols., 1995). En tanto que el enlace entre CaM y cNOS es dependiente de calcio y regulado por la actividad enzimática, la formación de iNOS requiere de un complejo muy estrecho con CaM pero depende muy poco de calcio, lo cual hace que sea prácticamente independiente de calcio (Marletta, 1994b; Xie y Nathan, 1994).

3.1.3 DISTRIBUCIÓN

La eNOS se encuentra enlazado a la membrana de varios tipos de arterias y células endoteliales venosas, músculo esquelético asociado a mitocondria (Pollock y cols., 1993).

La iNOS se encuentra en distintos tipos celulares, que van desde macrófagos, hepatocitos, miocitos, osteocitos, células del músculo liso, epiteliales, de Kupffer, microglía, condrocitos y epiteliales. (Forstermann y col. 1995a). La nNOS se expresa en terminales sinápticas de neuronas no colinérgicas y no adrenérgicas a través de todo el cuerpo incluyendo los tractos respiratorios, urogenitales, gastrointestinal, en ciertas áreas del cordón espinal, en ganglios simpáticos y glándulas adrenales, en una variedad de células epiteliales, en células maculo-densas del riñón, islotes pancreáticos y músculo esquelético de ratas y humanos (Forstermann y col.1995b; Nathan-Xie, 1994a; Zhang y col., 1993).

4.0 PEROXINITRITO (ONOO⁻)

4.1 GENERALIDADES

Después del descubrimiento del $\cdot\text{NO}$ y del $\cdot\text{O}_2^-$, se llevaron a cabo estudios que relacionaban a ambas especies con roles biológicos. En 1990 Beckman y cols. (1990) publicó un documento, en el cual se sugería que los radicales $\cdot\text{NO}$ y $\cdot\text{O}_2^-$ podrían combinarse y formar al ión ONOO⁻ y que el ácido peroxinitroso (ONOOH) es una fuente de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) con actividad biológica. En 1991 Radi y cols. (1991), también sugirió la posibilidad de que esa especie explicara en parte la toxicidad relacionada con su excesiva producción en sistemas biológicos. A partir de esos y otros estudios mas, se ha derivado la idea de que el ONOO⁻ está implicado en una creciente lista de procesos biológicos, entre otros, las enfermedades neurodegenerativas, debido a que es un poderoso oxidante, más reactivo que sus precursores radicales, además de formar otras especies igualmente oxidantes.

4.2 FORMACIÓN DEL ONOO⁻ *IN VIVO*

El peroxinitrito es el producto de la reacción de recombinación entre las siguientes especies: $\cdot\text{NO} + \cdot\text{O}_2 \rightarrow \text{ONOO}^-$ (1)

Con un rango constante de formación alto (Huie y Padmaja, 1993)

Sin embargo el peroxinitrito se encuentra en equilibrio con el ácido peroxinitroso de acuerdo a la siguiente reacción : $\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{ONOOH}$ (2)

El $\cdot\text{NO}$ es un gas neutro e hidrofóbico, capaz de cruzar las membranas lipídicas, mientras que el $\cdot\text{O}_2^-$ es un anión a pH neutro ($\text{pK}_a = 4.8$), la formación del peroxinitrito ocurrirá predominantemente en el sitio de formación del $\cdot\text{O}_2^-$; posteriormente el ONOO⁻ cruzará la membrana por difusión pasiva como ácido conjugado (ONOOH, $\text{pK}_a=6.8$)

o en forma aniónica, a través de canales aniónicos (Denicola y cols., 1998).

El ONOO⁻ es relativamente estable, por lo tanto el ONOOH se homoliza para formar bióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y $\cdot\text{OH}$. Inicialmente formados en un medio solvente, el 70%

de los radicales se recombinan para formar nitrato (NO_3^-), mientras que el 30% escapa para formar $\cdot\text{OH}$ libre y radicales bióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) (Beckam y cols., 1990; Augusto y cols., 1994 ; Radl y cols 2001). El principal producto de formación de la reconversión del ONOO^- en ausencia de blancos es el nitrito (NO_2^-) (Anbar y Taube, 1954; Bohle y Hansert, 1997), mientras que productos de la reacción secundaria también pueden formar NO_2^- y bióxido (NO_2), particularmente a pH alcalino (Coddington y cols., 1999; Pfeiffer y cols., 2000;).

El ONOO^- es más reactivo que sus precursores con potencial de reducción de 1 y 2 electrones de $E^\circ[\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+ / \cdot\text{NO}_2, \text{H}_2\text{O}] = 1.6-1.7 \text{ V}$ y $E^\circ[\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+ / \text{NO}_2^-, \text{H}_2\text{O}] = 1.3-1.37\text{V}$ respectivamente (Merenyi y Lind, 2000; Koppenol y cols., 1996), por lo tanto el peroxinitrito es un fuerte oxidante, por lo que es capaz de oxidar un amplio rango de biomoléculas.

4.2.1 TOXICIDAD

El peroxinitrito provoca la oxidación de tioles (Radl y cols 1991), sulfuros (Padmaja y cols. 1996), complejos de metales de transición (Goldstein y Czapski, 1995), ascorbato (Barlett y cols. 1995), olefinas, bencenos, fenoles (Halfpenny y Robinson, 1992; Ischiropoulos y cols., 1992), y otros compuestos aromáticos descritos. El peroxinitrito es un oxidante particularmente efectivo de moléculas aromáticas y compuestos organosulfurados que incluyen aminoácidos libres y residuos peptídicos (Szabó y cols 1997). La cisteína y el glutatión son componentes importantes en sistemas antioxidantes que son convertidos a disulfuros. La metionina es convertida a sulfóxido o es fragmentado a etileno y dimetilsulfóxido, a su vez el dimetilsulfóxido es oxidado a formaldehído. La tirosina y el triptófano bajo oxidaciones de un electrón a radicales catión, los cuales compiten para hidroxilar, nitrar y dimerizar (Ischiropoulos y cols., 1992). Los nucleótidos de purina son vulnerables a la oxidación y forman aductos (Douki y Cadet, 1996). La formación de la 3-nitrotirosina es particularmente favorable y la aparición del producto en muestras biológicas es tomado como diagnóstico de exposición al peroxinitrito.

En sistemas *in vitro*, el peroxinitrito tiene una alta reactividad, que incluye una rápida oxidación a grupos sulfhidrilos y tioeteres como también nitración e hidroxilación a compuestos aromáticos, incluyendo tirosina, triptófano y guanina. Mientras la reacción con

grupos sulfhidrilos es directa con el peroxinitrito, la nitración de tirosina probablemente esté asociada con la formación del catión nitrosonio (NO_2^+) Intermediario. La detección de 3-nitrotirosina por técnicas analíticas e Inmunológicas ha establecido que el marcador Incrementado en la nitración de nitrotirosina ocurre en una cantidad importante de patologías (Greenacre e Ischiropoulos, 2001). Otras reacciones como la reacción catalizada por la mieloperoxidasa puede también contribuir a la nitración de nitrotirosina, también en estados patológicos (Halliwell, 1997).

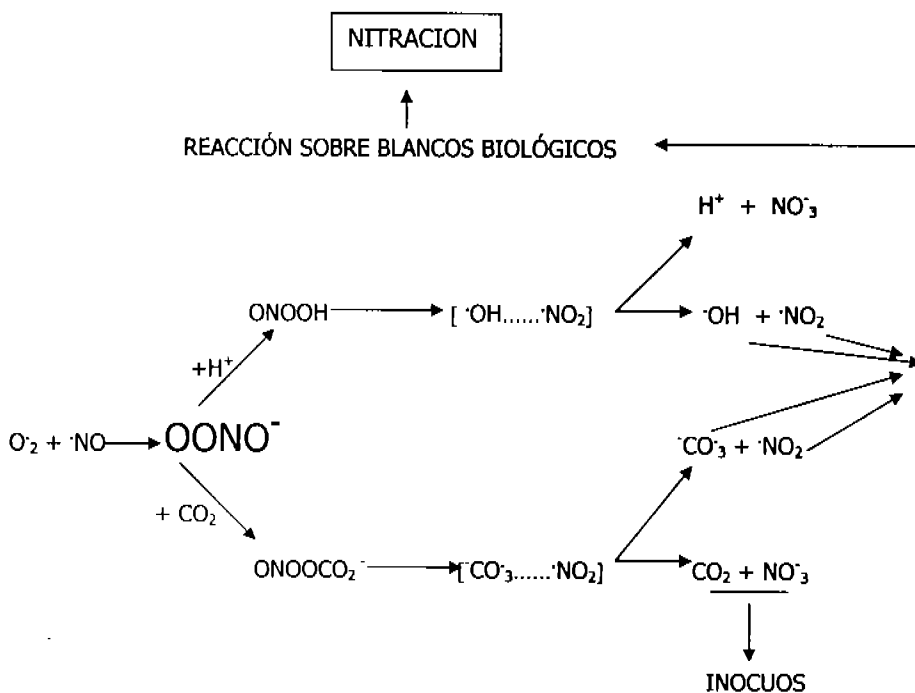
Las diversas reacciones del peroxinitrito, cuando ocurren durante la reacción con enzimas, macromoléculas y lípidos, han demostrado influencia en las funciones celulares. Por lo tanto la nitración de tirosina puede llevar a la disfunción de las proteínas nitradas como ha sido evidenciado en el caso de la SOD, actina, tirosina hidroxilasa neuronal, citocromo P-450 y prostaciclina sintasa (Greenacre e Ischiropoulos, 2001). La oxidación de los grupos sulfhidrilos es crítico y es la razón directa de la inhibición de la mitocondria mediante la aconitasa citosólica (Hausladen y Fridovich, 1994). Existe también evidencia de que el peroxinitrito puede causar modificación covalente de un sitio tiol activo del gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (Mohr y cols. 1994), el peroxinitrito también media la nitración de la actividad de la creatín cinasa miofibrilar, que puede llevar a la disfunción contráctil del corazón (Mihm y cols., 2001). El peroxinitrito también inhibe una variedad de bombas iónicas incluyendo las bombas de calcio (Klebl y cols. 1998), y sodio/potasio (Muriel y Sandoval, 2000).

La reacción del peroxinitrito con lípidos lleva a la peroxidación (malondialdehído y formación de dienos conjugados), y la formación del nitro- nitroperoxo- y/o oxidación de aductos de lípidos nitrados (Rubbo y cols., 1994).

Recientemente se ha descubierto que el peroxinitrito potencializa la oxidación de ciertas moléculas. La oxidación mediada por peroxinitrito de tetrahidropterinas (BH_4) a la forma quinonoide de 5,6-dihidropteridinas ha sido demostrada *in vivo*. Una proporción larga de los isómeros quinonoideos se pierde rápidamente dentro de la cadena para formar 7,8-dihidropteridina el cual no es un cofactor de NOS, así tanto en el endotelio celular y otros tipos celulares, con niveles bajos de BH_4 patofisiológicos, se puede promover un ciclo para su propia destrucción mediada por la formación de NOS dependiente del peroxinitrito (Milstein y Katusic, 1999). Éste mecanismo puede contribuir a la disfunción vascular endotelial inducida por estrés oxidativo en varias enfermedades.

Es importante hacer notar que el peroxinitrito puede dañar moléculas antioxidantes, como la MnSOD (Ischloropoulos y cols., 1992; MacMillan-Crow y cols., 1998), glutaredoxin (Aykac- Toker y cols., 2001) y otras como el glutation (Cuzzocrea y cols., 1998). El peroxinitrito también puede ocasionar daño a nivel genético por rupturas y deaminación al DNA(Rojas-Walker y cols., 1995)

Esquema del Peroxinitrito:



Gráfica 4

Efectos del peroxinitrito

5.0 METALOPORFIRINAS (FeTPPyP)

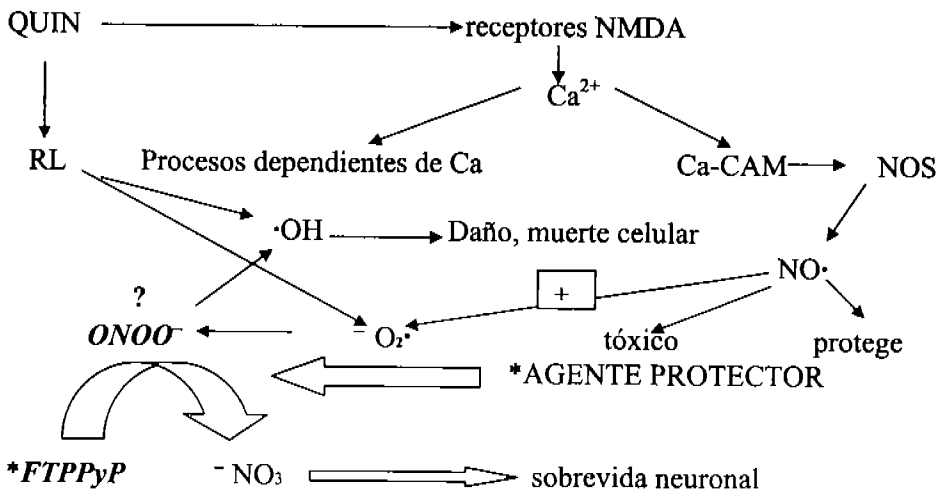
La capacidad de catálisis sobre los peróxidos por parte de las metaloporfirinas es evidenciada entre otros investigadores por Traylor y cols. (1992), al demostrar la descomposición de peróxidos con compuestos anillados.

El trabajar con el 5,10,15,20-Tetrakis (pentafluorofenil) porfirín cloruro de fierro III (FeTPPyP) y otras porfirinas electronegativamente sustituidas, llega a producir de 60 a 100% de rupturas de anillos epóxidos hidroperoxilados, como principio para demostrar el efecto catalizante (en este caso de ruptura) sobre los *peróxidos*, además de demostrar también que sus productos de descomposición no forman radicales libres, ya que se favorecen fuertemente rupturas heterolíticas sobre las homolíticas en medios protonados (Traylor y cols.,1992). Se sabe también que otras ferro-proteínas, tales como el Fe(III)-5,10,15,20-Tetrakis (N-metil-4'-piridil) porfirinato (FeTMPyP), pueden catalizar la descomposición de ONOO⁻ a nitrato (Stern y cols., 1996; Hunt y col., 1997; Imam y cols, 1999). En consecuencia, las metaloporfirinas pueden ser empleadas como agentes terapéuticos potenciales para procesos inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas que involucren la formación de especies reactivas (Salvemini y cols., 1998; Stern y cols.,1996; Imam y cols.,1999).

Todos estos antecedentes sugieren que el empleo del FeTPPyP para el tratamiento de los eventos tóxicos que pudieran generarse a partir de procesos excitotóxicos constituyen esencialmente un reto farmacológico interesante y que su abordaje en el modelo experimental de la HD producido por el QUIN puede proveer información importante sobre los mecanismos vía especies reactivas (NO y ONOO⁻) de daño neuronal involucrados en esta neuropatía y sobre el diseño y orientación de sus posible alternativas terapéuticas.

6.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El QUIN induce un evento neurotóxico generado a partir de un proceso excitotóxico debido a dos principales vías de daño: primero, por una activación de receptores NMDA, que provoca una entrada masiva de calcio, mismo que dispara procesos dependientes de calcio, como Ca-calmodulina, que activa la síntesis de NOS, con la síntesis concomitante de $\text{NO}\cdot$. Y segundo, generando especies reactivas por sí mismo, vía reacción de Fenton (Platenik y col. 2001)



Gráfica 5 Planteamiento del problema.

Por lo tanto si el anión peroxinitrito se encuentra involucrado en este patrón de daño vía radicales libres, entonces el empleo de el FeTPPyP como isomerizador del peroxinitrito, debe atenuar la neurotoxicidad, producida por el QUIN., de ser cierto lo anterior se podría sugerir el eventual diseño y orientación de sus posible alternativas terapéuticas, aparte de clarificar aún mas el mecanismo por el cual el QUIN produce dicha neurotoxicidad.

❧ HIPÓTESIS ❧

II

Debido a que el QUIN se emplea para la inducción de un modelo experimental de la enfermedad de Huntington, reproduciendo sus parámetros bioquímicos, histopatológicos y conductuales en ratas, además de ser un bien documentado metabolito endógeno del triptofano y potente agente prooxidante, se propone que el pretratamiento agudo con el FeTPPyP atenuará la neurotoxicidad estriatal producida por el QUIN reduciendo el daño provocado por las especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno, evidenciando así la participación del estrés oxidante y nitrérgico mediado por el peroxinitrito en el patrón de neurotoxicidad evocado por el QUIN.

OBJETIVOS

III

GENERAL

Caracterizar los efectos de la administración aguda del FeTPPyP como pretratamiento sobre diferentes marcadores de neurotoxicidad y daño oxidativo evocados por la administración Intraestriatal de QUIN a ratas, y evidenciar la posible participación del peroxinitrito en un modelo experimental de la HD.

PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del pretratamiento con FeTPPyP sobre la peroxidación lipídica producida por el QUIN en el cuerpo estriado de rata.
2. Evaluar el efecto del pretratamiento con FeTPPyP sobre el patrón conductual de rotación producido por la administración Intraestriatal de QUIN a ratas.
3. Evaluar el efecto del pretratamiento con FeTPPyP sobre los niveles estriatales de ácido γ -aminobutírico (GABA) en animales lesionados Intraestriatalmente con QUIN.
4. Evaluar el efecto del pretratamiento con FeTPPyP sobre la formación de 3-NT, inducida por QUIN en cuerpo estriado de rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

IV

1. REACTIVOS Y ANIMALES

Se usó agua desionizada para la preparación de todos los reactivos y soluciones. El QUIN, el 5,10,15,20-Tetrakis (pentafluorofenil)-21H,23H-Porfirincloruro de Hierro (III)(FeTPPyP), la apomorfina (APO), la albúmina bovina, el HEPES, el o-phtaldehído (OPA), el 2-mercaptoetanol, el ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA), un kit de estándares de L-aminoácidos para cromatografía de líquidos y la formalina, se obtuvieron todos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La parafina de Inclusión de Oxford Labware (St. Louis, MO, USA). El resto de los reactivos, incluyendo solventes, fueron obtenidos de otras conocidas casas comerciales (E. Merck, México y J.T. Baker, México). El anticuerpo policlonal de conejo contra nltrotirosina se obtuvo de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA).

Se emplearon ratas Wistar machos (250-300 g), las cuales fueron obtenidas del Bioterio del I.N.N.N. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (5 por caja), con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, y bajo condiciones constantes de luz (ciclos de 12:12 hrs. de luz: obscuridad), temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad.

2. TÉCNICAS

En el siguiente diagrama de flujo, se resumen los procedimientos experimentales abordados en este estudio:

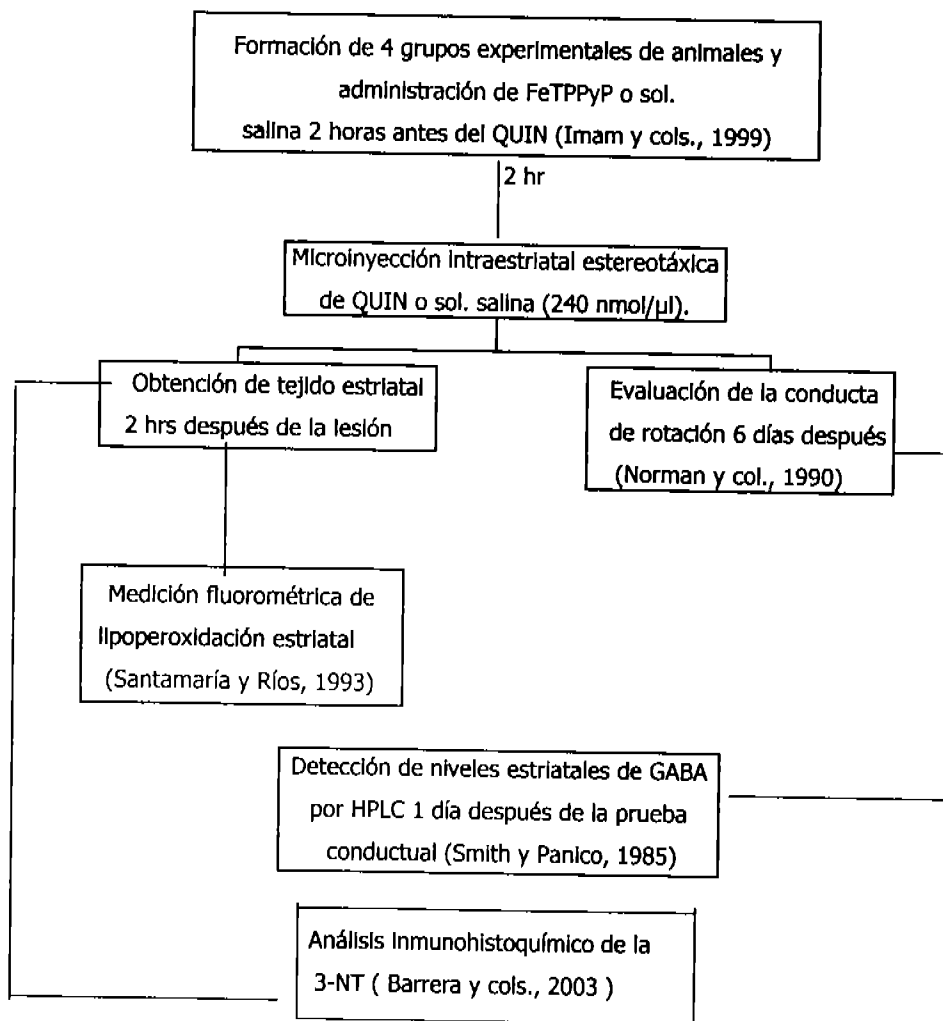


Diagrama de flujo del diseño experimental

1. PRETRATAMIENTO DE LOS ANIMALES CON FeTPPyP E INYECCIÓN INTRAESTRIATAL CON QUIN

Todos los experimentos se realizaron en el Lab. de Aminoácidos Excitadores del I.N.N.N.. Se diseñaron 4 grupos experimentales:

- 1) solución salina (S.S.) intraperitoneal (i.p.) + S.S. Intraestriatal (i.e.)
- 2) FeTPPyP (10 mg /Kg i.p.) + S.S. (i.e.)
- 3) S.S. (i.p.) + QUIN (i.e.)
- 4) FeTPPyP (10mg /Kg i.p.) + QUIN (i.e.).

La solución administrada por vía intraperitoneal, según el grupo, fue inyectada dos horas antes de la inyección i.e. con QUIN o salina. Cumplido el tiempo, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0.2 ml/250 g de peso) e inyectadas unilateral y estereotáxicamente (coordinadas de acuerdo al Atlas estereotáxico de cerebro de rata de Paxinos y Watson, 1894) en el estriado derecho (caudado/putamen) con S.S. (pH 7.4) ó QUIN (240 nmol/ μ l, pH 7.4), según el grupo de tratamiento. La inyección en estriado se realizó en un lapso de 2 min. y se mantuvo la aguja en la zona de lesión por 2 min. más para permitir la adecuada difusión de la solución inyectada.

2. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS (MÉTODO FLUOROMÉTRICO)

Se desarrolló el método fluorométrico de detección de productos de la peroxidación modificado por Santamaría y Ríos (1993) a partir de un reporte original de Triggs y Willmore (1984). Dos horas después de la inyección estriatal de QUIN a las ratas, se midieron los productos fluorescentes derivados de la peroxidación, según los siguientes pasos:

- A) El tejido estriatal extraído se pesa y se homogeniza en 3 ml de solución salina (0.9 % NaCl).
- B) A 1.0 ml del homogenado se adicionan 4.0 ml de una mezcla cloroformo:metanol (relación 2:1, v:v), y se mezclan vigorosamente por 60 segundos

- C) Se dejan reposar los tubos en hielo durante 45 min protegidos de la luz y la fase lipídica (correspondiente a la fracción clorofórmica) se separa por extracción de la fase metanólica, la cual se desecha.
- D) Se procede a la medición de la señal de fluorescencia en cada muestra en un espectrofotómetro de luminescencia Perkin-Elmer LS50B, a longitudes de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 430 nm, con un ancho de banda de 15 nm (la sensibilidad de espectrómetro fue ajustada previamente con un estándar fluorescente de quinina (0.1 µg/ml) en ácido sulfúrico 0.05 M, a 300 unidades).
- E) Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia/g de tejido fresco.

3. CONDUCTA DE ROTACION

- A) En lotes independientes de animales sometidos a los mismos tratamientos, al sexto día de la administración i.e. de QUIN, los animales fueron administrados con apomorfina (APO, 1.0 mg/kg, s.c.) y se procedió a la evaluación conductual (Schwarcz y cols., 1979; Norman y cols., 1990).
- B) Cada animal se separó y se mantuvo en forma individual en cajas de acrílico para su observación.
- C) Cinco minutos después, se registró el número total de giros ipsilaterales de c/animal durante 60 min. Cada rotación se definió como un giro completo de 360° sobre sus patas traseras. La APO, como agonista dopaminérgico, produce una conducta de rotación característica de lesiones estriatales unilaterales; en este caso, los giros fueron ipsilaterales al lado lesionado, como otros ya han reportado (Susel y cols., 1989; Santamaría y Ríos, 1993; Santamaría y cols., 1996; Santamaría y cols., 1997).
- D) Los resultados finales se expresaron como No. de giros ipsilaterales/hr.

4. CONTENIDO ESTRIATAL DE GABA

La estimación del contenido estriatal de GABA se desarrolló en los diferentes grupos experimentales, de acuerdo al método reportado por Santamaría y cols., (1996 y 1997).

- A)** Siete días después de la administración i.e. del QUIN, todos los animales se inyectaron con un Inhibidor de la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), el ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) (1.2 mmol/kg, i.v.). Esto se realizó con la finalidad de prevenir un incremento *postmortem* de GABA en las muestras (van der Heyden y Korf, 1978).
- B)** Dos minutos después, se sacrificaron las ratas y se extrajo el estríado derecho.
- C)** Se homogenizó el tejido en 15 volúmenes de metanol:agua (85 %, v:v).
- D)** Las muestras se centrifugaron durante 15 min. a 3,000 X g.
- E)** El sobrenadante se almacenó a -40°C hasta el análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se realizó por HPLC con detección fluorométrica por una reacción de derivatización (Fleury y Ashley, 1983; Smith y Panico, 1985). Se empleó un programa de gradiente lineal de 10 a 65 % de metanol bajo las siguientes condiciones:

- A)** A 100 µl de sobrenadante del paso E, se adicionaron 100 µl de ortoaldehído, (OPA, 5 mg de OPA + 625 µl de metanol + 5.6 ml de buffer de boratos 0.4 M (pH 9.5) + 25 µl 2-mercaptoetanol) y se agitaron los tubos por 1 min.
- B)** Se inyectaron 20 µl de la mezcla anterior en un cromatógrafo de líquidos BAS CC-5, el cual contenía una columna de fase reversa OPA-HS Alltech. La mezcla de gradiente consistió de solución amortiguadora de acetato sódico 50 mM (pH 5.9) + 1.5 % v:v de tetrahidrofurano y metanol grado HPLC. Se empleó un detector de fluorescencia BAS FL-45A.
- C)** Los resultados finales se expresaron como µg GABA/g de tejido fresco.

5. DETECCIÓN DE 3-NITROTIROSINA (3-NT)

El análisis de 3-NT se desarrolló por inmunohistoquímica modificado por Barrera y cols., (2003). Dos horas después de la inyección intraestriatal de QUIN a las ratas, se sacrifican y se procede a extraer el estríado del lado lesionado; se fijan, (mantenidos en solución de formalina) hasta el análisis posterior según los siguientes pasos:

- A)** Se someten individualmente a una solución de etanol 100% durante una hora, en tres repeticiones sucesivas (baños distintos), con el objeto de desplazar al fijador.
- B)** Se someten de manera semejante a una solución de xilol en otros tres baños una hora c/u con el objeto de desplazar al etanol.
- C)** Después de la deshidratación en los baños, se procede a la inclusión en parafina líquida.
- D)** El cuerpo estriado ya incluido en parafina, se rebana en un microtomo en secciones de 4 μ m de espesor después de lo cual se pasan a un baño de flotación (agua con grenetina) a una temperatura de 40-45° con el objeto de que los cortes que están plegados se extiendan y se logre su adhesión al portaobjetos.
- E)** Se deja secar cada portaobjetos.
- F)** Para desparafinar los tejidos, primero son sumergidos 2 veces en xilol 5 minutos cada baño, luego se inicia el proceso de hidratación: Xilol-alcohol: 1:1 (2 baños), el primero es con alcohol 100%, el segundo con alcohol 96%, finalmente en un baño con agua desionizada por el mismo tiempo.
- G)** Se contrasta con hematoxilina y se inhibe la peroxidasa endógena, mediante la adición de peróxido de metanol (6ml /40ml).
- H)** Se bloquea con albumina 3%, 30 min.
- I)** Se enjuaga en una solución de PBS y se adiciona el anticuerpo secundario (antinitrotirosina) en solución que contiene albumina 1%.
- J)** Se exponen por un día y se procede al análisis visual en microscopio de luz.

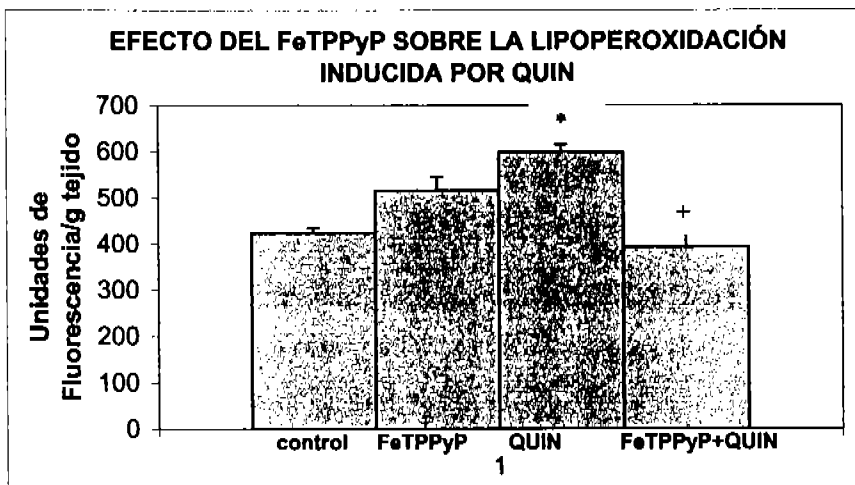
RESULTADOS

V

1. PEROXIDACIÓN ESTRIATAL DE LÍPIDOS

Se presentan resultados de la lipoperoxidación estriatal de animales tratados con QUIN y FeTPPyP (Gráfica 1)

Se observa un incremento de 42% de lipoperoxidación Inducida por QUIN con respecto al control, mientras que el FeTPPyP previene esa tendencia. El dato del tratamiento sólo con FeTPPyP muestra un aumento no significativo del 20% respecto al grupo control.



* $p < 0.01$ vs control; + $p < 0.01$ vs QUIN

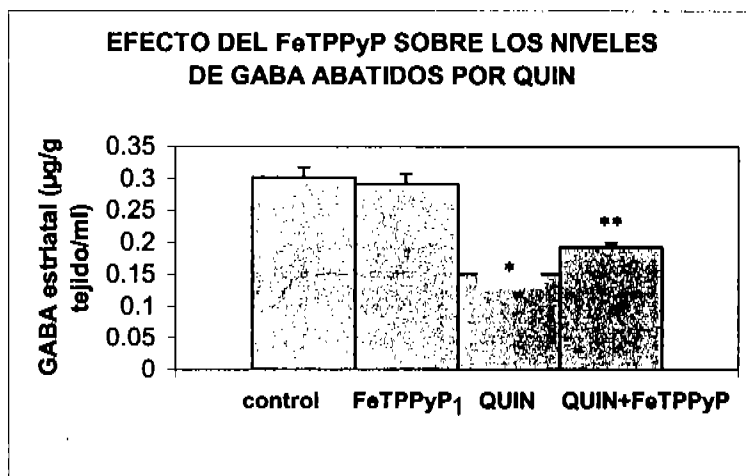
Grafica 1

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA simple, seguido por una prueba de Tukey. Con n entre 5 y 6 ratas

2. EFECTO DEL TETRAKIS EN LOS NIVELES ESTRIATALES DE GABA

Se presentan datos de los niveles estriatales de GABA en animales tratados con QUIN y TETRAKIS; y los resultados están dados en ($\mu\text{g/g}$ de tejido/ml).

Los cambios inducidos por QUIN en el contenido estriatal de GABA se muestran en la gráfica 2. El QUIN produjo una disminución significativa de -50% *vs* el control en los niveles de GABA, mientras que el grupo de FeTPPyP+QUIN atenuó el efecto del QUIN incrementando su valor en un 33.34% respecto al control, ejerciendo una tendencia hacia la protección.



* $p < 0.01$ *vs* el control, y ** $p < 0.05$ *vs* el control

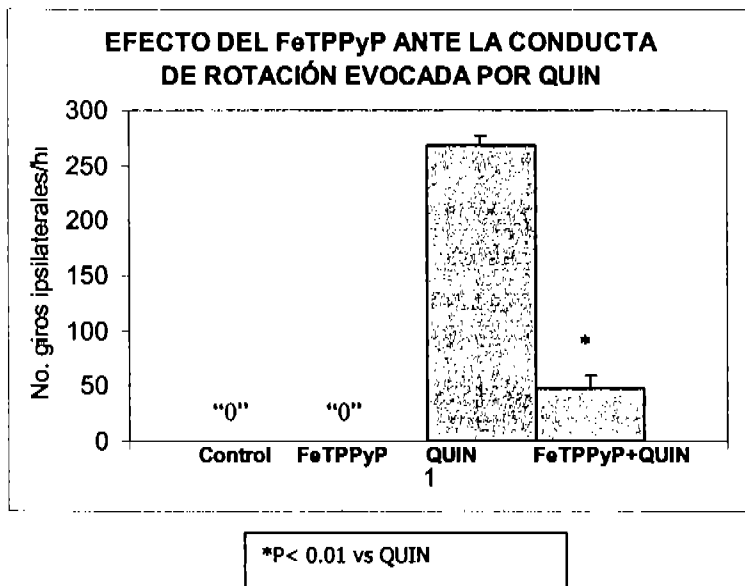
Gráfica 2

El análisis estadístico realizado fue ANOVA simple seguido por la prueba de Dunnett. Con n entre 5 y 7 ratas

3. EFECTO DEL TETRAKIS SOBRE LA CONDUCTA DE ROTACIÓN INDUCIDA POR QUIN

En la gráfica 3 se presentan los resultados de la conducta de rotación en animales tratados con QUIN y FeTPPyP, y se reporta como el número de giros Ipsilaterales por hora.

Los animales control mostraron irritabilidad y excitación después de la inyección de apomorfina, como ha sido reportado por Norman y cols. (1990) y por Santamaría y cols. (1996), pero no mostraron conducta de rotación alguna. Los animales lesionados con QUIN (ver gráfica 3) presentaron un marcado número de giros después de la inyección de apomorfina, mientras que el FeTPPyP atenuó significativamente la conducta de rotación inducida por el QUIN



Gráfica 3

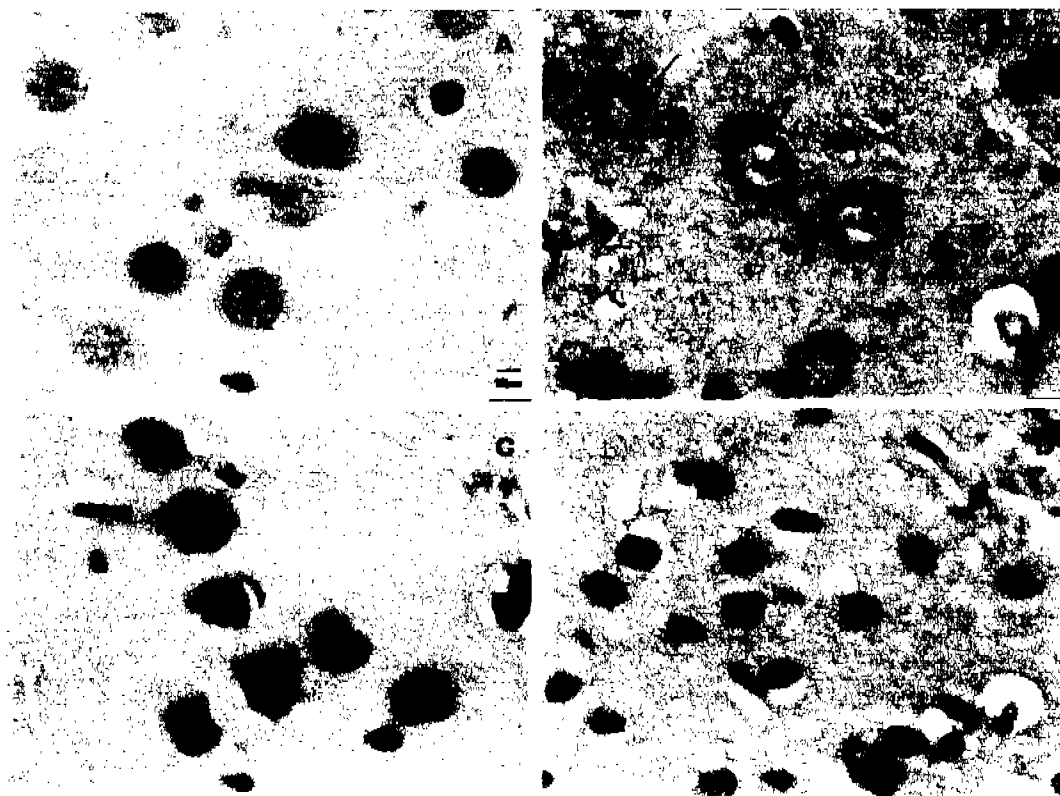
Análisis estadístico realizado por una prueba no paramétrica: prueba de suma de rangos de Wilcoxon o de comparación entre dos poblaciones. Con n entre 5 y 6 ratas

4. EFECTO DEL TETRAKIS SOBRE LA 3-NITROTIROSINA

Greenacre e Ischiropoulos en 2001, establecieron que la reacción incrementada en la nitración de la 3- nitrotirosina (3-NT) es un buen marcador (Hoy ampliamente reconocido) de la presencia de peroxinitrito.

En gráfica 4 se muestran los resultados de la Inmunohistoquímica, para evidenciar la inmunoreactividad hacia la 3-NT, que ha formado el peroxinitrito. Éstos grupos marcados se manifiestan con una coloración café (como evidencia del daño por QUIN en la foto B), en donde además se puede apreciar daño al tejido y núcleos picnóticos. En la foto D se observa la protección que ejerce el FeTPPyP, ya que no hay evidencias de daño por QUIN. La Inmunohistoquímica esta contrastada con hematoxilina y cada centímetro es equivalente a 10 μm

4. EFECTO DEL TETRAKIS SOBRE LA 3-NITROTIROSINA



Gráfica 4

Micrografía que muestra los cortes estriatales de rata, para el estudio de inmunohistoquímica contra 3-NT, contrastado con hematoxilina a 40x. A) Animales control, B) Animales con QUIN muestra la elevada reactividad (coloración café) hacia 3-NT, con daño a diferentes tipos celulares (flecha), se aprecia daño al neuropilo y cuerpos celulares picnóticos. C) Animales con FeTPPyP, D) Animales tratados con FeTPPyP+QUIN, donde no se observa reactividad hacia 3-NT.

DISCUSIÓN

VI

En este trabajo se presentan evidencias de la efectividad catalítica *in vivo*, que posee un nuevo catalizador de peroxinitrito, el FeTPPyP.

Entre los resultados obtenidos, se muestra una protección total en los niveles de peroxidación lipídica, en donde abate los niveles elevados por el QUIN, y se observa una diferencia significativa entre el QUIN y el grupo control, lo que comprueba que el QUIN eleva sustancialmente los niveles de lípidos peroxidados como evidencia del daño inducido en este modelo, y por otro lado se comprueba la protección del FeTPPyP.

Este resultado se correlaciona con la tendencia hacia la protección, sobre los niveles de GABA, donde apreciamos una disminución de casi 50% en los niveles de GABA estriatales con animales tratados con QUIN con respecto al grupo control, y la tendencia hacia la recuperación del mismo parámetro, provista por el FeTPPyP (grupo tratado con FeTPPyP+QUIN). Pero la evidencia más clara del efecto protector, ante el daño por el QUIN, se encuentra en la conducta de rotación debido a que es un parámetro Integrativo y global del daño por QUIN donde se involucra la función de los ganglios basales a nivel periférico y que se refleja en la conducta del animal (Shwarcz y cols., 1979; Norman y cols; 1990). Esta evaluación permite poner de manifiesto un daño más extenso. Además se aprecia una disminución marcada en la conducta de rotación, ya que las ratas tratadas con QUIN giran alrededor de 300 vueltas en promedio, mientras que las ratas tratadas con FeTPPyP + QUIN dan de 40 a 50 giros, lo que sustenta su efectividad. Finalmente, para poner de manifiesto la participación del peroxinitrito y la oportuna intervención por parte del FeTPPyP a nivel celular, se recurrió a la medición de la 3-NT, mediante una técnica de inmunohistoquímica conocida y modificada por Barrera y cols. (2003), que es el reconocido marcador de daño y presencia de peroxinitrito (Beckman y cols.,1990; Ischiropoulos y cols.,1992), en donde se observa que en cortes de tejido estriatal contrastadas con hematoxilina, se produce una coloración café-oscura sobre un fondo rosa del tejido, que corresponden al cerebro de un animal lesionado con QUIN, núcleos

picnóticos y neuropilio alterado que evidencian mayor coloración, tomados éstos como reactividad contra 3-NT, a diferencia tanto del grupo tratado con FeTPPyP sólo, y en el grupo control, así como el grupo tratado con FeTPPyP+QUIN, en donde se aprecia morfológicamente un aspecto esponjoso alrededor de las células, sin embargo resulta evidente que no hay reactividad hacia el peroxinitrito; es decir, no se aprecia coloración café, lo que se toma como ausencia aparente de reactividad frente a la 3-NT ó ausencia Indirecta de peroxinitrito.

Por lo tanto la evidencia de la disminución de los niveles de peroxinitrito, correlacionada con los parámetros de daño inducida por el QUIN, sugieren un papel de protección potencial en procesos patológicos para una variedad de padecimientos. Los resultados encontrados en este trabajo proveen una evidencia más de la intervención del peroxinitrito en respuestas al estrés oxidante, ya sea vía formación de ROS, o como de RNS en condiciones *in vivo*, por la intervención directa de un fármaco que actúa para descomponer al peroxinitrito, sin la formación de otras especies reactivas.

El papel que juega el NO en procesos fisiológicos y en procesos patológicos ha sido extensamente documentado (Moncada y cols.1991; Nathan y cols. 1994a). Al principio sólo se creía que el NO tenía una función de mediador celular y de factor de relajación muscular, sin embargo en la actualidad diversos estudios ponen de manifiesto que en condiciones patofisiológicas, media el daño, siendo el precursor directo del peroxinitrito (Beckman y cols. 1990). Sin embargo, al mismo tiempo el NO puede ejercer un efecto citoprotector (Rubbo y cols. 1994; Lipton y cols 1993). Contrariamente, el peroxinitrito es cinéticamente favorecido como producto de la reacción con el NO (Hassan H.M. 1988), con las consecuencias que ello acarrea, como molécula altamente oxidante y muy reactivo en condiciones fisiológicas (Beckman y cols. 1993, 1996; Pryor y cols., 1995).

Se piensa que el peroxinitrito posee una naturaleza de radical libre doble, que por una parte es capaz de peroxidar los lípidos como radical hidroxilo y por otra nitrar especies de tirosina ($\text{NO}_2^{\cdot-}$). La estabilidad del peroxinitrito es dependiente del pH, que puede sufrir protonación en su descomposición al formar nitratos o la iniciación a procesos oxidativos incluyendo peroxidación lipídica y nitración de tirosina (Radl y cols., 1991). De los derivados del peroxinitrito, un compuesto es dirigido hacia una vía no destructiva que podría incrementar nitrato, mientras se reduce el daño iniciado por radicales libres a blancos moleculares críticos dentro de la célula. Los cambios patológicos producidos por la

formación del peroxinitrito podrían ser la causa de la intervención farmacológica ya sea a sus reactivos (NO) o productos (Peroxinitrito). De hecho, el uso de la SOD Cu/Zn y la Inhibición de la NOS han resultado efectivos contra padecimientos Inflamatorios, administrados tanto aguda como crónicamente (Salvemini y cols., 1998; Chan y cols., 1991). Recientemente, una nueva clase de agentes antiinflamatorios, que catalizan la descomposición del peroxinitrito han sido propuestos (Stern y cols. 1996). La propuesta para el mecanismo de descomposición del peroxinitrito, es que el peroxinitrito se isomeriza, e incrementa la formación del nitrato, que es la mejor ruta para su descomposición (Stern y cols., 1996; Beckman y cols., 1996; Pryor y cols., 1995), mientras el marcador (la formación de 3-NT) disminuye.

Por su parte el modelo de Huntington en ratas, inducido por el QUIN, es uno de los modelos farmacológicos más aceptados y reconocidos (Beal y cols, 1986a; Schwarcz y cols., 1984), por lo que está bien caracterizado en cuanto a sus mecanismos, sin embargo, el acercamiento sobre el nivel al que el peroxinitrito está contribuyendo en el patrón de daño del QUIN, está demostrando la vía para una oportuna y temprana Intervención farmacológica antes de que se genere un daño mayor; por lo tanto éstos datos deben tomarse en cuenta ante el eventual diseño de un fármaco, que debido a la naturaleza de las enfermedades neurodegenerativas, brinde junto con otros medicamentos ya probados, un verdadero apoyo que detenga aún más eficientemente el progreso de la patología y al mismo tiempo provea una mejor calidad de vida a pacientes neurológicos, ya que las evidencias halladas de la participación del peroxinitrito en la contribución del daño ocasionado por el QUIN, implica por una parte que, una vez formado el peroxinitrito, el daño puede conducirse por diversos caminos oxidativos ya sea vía nitración de proteínas ó vía la formación de $\cdot\text{OH}$, de modo tal que la repercusión del daño se amplifica al grado que las células resienten el ataque, tal vez de manera simultánea, implicando con esto alguna eventual respuesta por parte de los sistemas antioxidantes. Aunque ha sido demostrado que la SOD Cu/Zn aumenta sus niveles ante un estado de estrés oxidativo por QUIN (Noack y cols.,1998), quizá la respuesta no sea suficiente para abatir el daño, de ahí la importancia del empleo de un fármaco capaz de evitar la formación de OONO^\cdot antes de un mayor daño. Es necesario también profundizar más en el estudio de factores de transcripción temprana, para hallar evidencias que permitan saber que impacto reciben los genes ante un insulto oxidativo, así como medir los cambios producidos por la regulación

directa del NO o \cdot OH, o incluso sobre una probable participación del peroxinitrito en la modulación de las respuestas antioxidantes, ya sea directamente sobre las enzimas antioxidantes en un curso-temporal o monitoreando genes tempranos, lo que ayudaría a un esclarecimiento sobre los mecanismos que se llevan a cabo en situaciones de estrés oxidativo y neurotoxicidad, estudios que se llevarán a cabo en nuestro laboratorio.

Por lo tanto el entendimiento del papel que juega el peroxinitrito en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas humanas conducirá al desarrollo de terapias racionales para la Intervención farmacológica oportuna y proporcionar bases para el mejor entendimiento de los procesos patológicos del SNC.

CONCLUSIONES

VII

- I. La administración tópica de QUIN al estriado de ratas alteró los diferentes marcadores de daño neuronal y oxidativo probados en el estudio.
- II. Existen evidencias en este modelo, de que el peroxinitrito está participando de manera activa en el patrón de daño inducida por el QUIN.
- III. La acción del FeTPPyP ante la lipoperoxidación inducida por QUIN mostró una tendencia protectora.
- IV. El FeTPPyP abatió la conducta rotacional producida por QUIN en ratas como evidencia de la preservación de neuronas espinosas de tamaño medio.
- V. El FeTPPyP atenuó la disminución estriatal de GABA inducida por QUIN en ratas.
- VI. Se demostró el efecto neuroprotector del FeTPPyP en el modelo de la enfermedad de Huntington en los diferentes marcadores evaluados, sugiriéndose un mecanismo de protección antioxidante temprana a través de la desactivación del peroxinitrito.
- VII. Se considera la necesidad de realizar estudios más detallados para adquirir un conocimiento más profundo acerca de los mecanismos por los cuales el FeTPPyP ejerce su protección, tal vez medir la formación de óxido nítrico sintasa mediante la producción de L-citrulina, estudios de genes de expresión temprana tanto para la apoptosis como la necrosis, así como la expresión de proteínas.

VIII ANEXO A

☞ ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON ☞

La enfermedad de Huntington (HD) fue descrita en 1872 por George Huntington, médico de Pomeroy, Ohio, en un documento que leyó ante la Meigs y Mason Academy of Medicine, y que se publicó más tarde en el *Medical & Surgical Reporter* de Filadelfia. Huntington ofreció una descripción sucinta y gráfica de la enfermedad que basó en las observaciones de los pacientes que su padre y su abuelo habían atendido durante su ejercicio profesional en East Hampton, Long Island. Habían aparecido con anterioridad algunos informes (consultar la referencia de DeJong (1973) para antecedentes históricos), pero las descripciones carecían de la precisión y la integridad que caracterizaron a la enfermedad de Huntington. Vessie, en 1932, pudo demostrar que prácticamente todos los pacientes de la porción oriental de los E.U. que experimentaban esta enfermedad podrían rastrearse, hasta que logró encontrar entre sus antecesores a cerca de seis individuos que habían emigrado en 1630 desde la minúscula aldea del este de Bures, en Suffolk, Inglaterra. Se rastrearon los casos de una familia notable durante cerca de 300 años a través de 12 generaciones, en cada una de las cuales se había expresado esta enfermedad y evidenciando desde un principio su carácter hereditario (Adams y cols, 1999).

Según Huntington, la regla general había sido que "...cuando uno o ambos padres han expresado manifestaciones de la enfermedad, la sufrirán invariablemente uno o más de sus descendientes, si viven hasta la vida adulta. Pero si por cualquier motivo éstos niños pasan por la vida sin ella, se rompe el hilo y los nietos y los bisnietos de los pacientes originales pueden estar tranquilos por que se encuentran libres de la enfermedad..." (Adams y cols. 1999).

Davenport, en 1915, en una revisión de 962 pacientes con la enfermedad, encontró sólo cinco que eran descendientes de padres no afectados. Posiblemente en estos últimos pacientes uno de los padres tenía el rasgo, pero en forma moderada. Es más probable que

estos pacientes representaran casos esporádicos de HD; es decir, casos en los que la mutación había ocurrido a partir de un gen normal hasta la forma mutante productora de la enfermedad (Adams y cols., 1999).

La HD se encuentra dispersa por todo el mundo, aún en los lugares más remotos, y ocurre con una prevalencia de entre 5 y 10 casos por cada 100,000 (Coneally, 1984). Interesantemente, la HD puede ocurrir en número más grande, saliendo de la estadística promedio, en algunos lugares específicos. Por ejemplo, la prevalencia de HD puede exceder de 100 casos por cada 100,000 en Lago de Maracaibo, Venezuela. En E.U., alrededor de 25,000 personas sufren de HD y 125,000 individuos están en riesgo de expresar la enfermedad (datos hasta 1997) (Adams y cols., 1999).

De 3 a 5 % de los casos se inician antes de los 15 años de edad y algunos lo hacen incluso en la infancia. En el 28 % de los casos los síntomas se ponen de manifiesto después de los 50 años de edad y el resto está entre los 35 y 45 años de edad. El progreso de la enfermedad es más lento en los pacientes ancianos que en los jóvenes. Una vez iniciada la enfermedad progresa de manera irreversible y sobreviene alguna complicación que termina con la vida del paciente (Adams y cols., 1999).

La comprobación genealógica exhaustiva ha establecido que la causa de HD es un gen autosómico dominante monohíbrido con penetrancia completa. Existe la hipótesis de que los pacientes jóvenes suelen heredar la enfermedad de sus padres, y los ancianos lo heredan de sus madres (Martin, 1984). Se ha llegado a observar la HD incluso en cuatro grupos de gemelos idénticos con iniciación casi a la misma edad (Adams y cols., 1999).

Hasta hace algunos años no era posible pronosticar la expresión de la enfermedad en los hijos de los pacientes afectados. El metabolismo de la glucosa en el núcleo caudado, que se mide mediante tomografía de emisión de positrones (PET), aunque reducido en la mayoría de los pacientes presintomáticos, no es un medio totalmente confiable para identificar a las personas en riesgo de desarrollar la enfermedad. El logro más importante con respecto a la identificación presintomática de la HD fue el descubrimiento de Gusella y cols. (1983) de un marcador relacionado con la enfermedad, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, específicamente en el locus IT15 (Kordower y cols., 1999). Estos investigadores, y otros más, identificaron la anomalía genética y encontraron que era un codón repetido (CAG) de cuya longitud de repeticiones depende la edad de inicio (anticipación) (The Huntington Disease Research Collaborative Group, 1993). Este

descubrimiento ha hecho posible desarrollar una prueba para identificar al gen defectuoso en individuos asintomáticos. Sin embargo, en consideración a que la enfermedad es incurable, esta prueba plantea problemas éticos para aplicarlo de manera generalizada (Martín, 1984).

La HD también es conocida por sus características clínicas como "corea de Huntington". El término corea viene del latín "*Choreia*" que significa "danza", es decir que la enfermedad involucra desórdenes del movimiento de tipo coreico (ver más adelante). Sin embargo, éstos no comienzan sino hasta avanzado el padecimiento, ya que la enfermedad inicia con ligeros trastornos en la conducta, cambios psiquiátricos seguidos de la corea, y que evolucionan hasta la demencia (Shoulson, 1984).

El inicio de la enfermedad presenta alteraciones psiquiátricas. El *trastorno mental* adopta varias formas sutiles mucho antes que se ponga de manifiesto el deterioro de las funciones cognitivas. En cerca de la mitad de los casos, los primeros síntomas en aparecer son alteraciones ligeras, y a menudo desconcertantes del carácter. Los pacientes empiezan a encontrar todo mal, a quejarse constantemente y a sermonear a otros miembros de la familia; pueden ser desconfiados, irritables, impulsivos, excéntricos, desaseados o excesivamente religiosos, o manifiestan un sentido falso de la realidad (Adams y cols., 1999). El descontrol de sí mismo puede reflejarse en explosiones de carácter, desaliento, alcoholismo o promiscuidad sexual. Estos trastornos emocionales y los cambios de la personalidad pueden alcanzar proporciones suficientes para poderse calificar virtualmente como psicosis (delirios o alucinaciones de persecución); son frecuentes los trastornos del humor, en particular la depresión (casi la mitad de los pacientes en algunas series), y pueden constituir los síntomas más prominentes al principio del padecimiento. Es invariable que, tarde o temprano, el intelecto empieza a fallar. El paciente se vuelve menos comunicativo y más aislado desde el punto de vista social. Pueden precipitar la consulta médica la disminución del rendimiento en el trabajo, incapacidad para hacer frente a las responsabilidades del hogar y trastornos del sueño. Hay además dificultades para conservar la atención, la concentración y la asimilación de nuevo material. La flexibilidad mental disminuye. Hay pérdida de las habilidades manuales finas. Las partes de rendimiento de la escala de inteligencia Wechsler del adulto (mayor detalle ver bibliografía), ponen de manifiesto una pérdida mayor que las partes verbales. La memoria está relativamente indemne. Esta pérdida gradual de la función intelectual se

ha caracterizado como "*Demencia Subcortical*", es decir, se observan sólo rara vez elementos de *Afasia* (trastorno del lenguaje que puede presentarse en diversas formas y que debe distinguirse de las alteraciones funcionales de los órganos ejecutivos de la fonación –motricidad de la articulación- conocida como *Disartria*), *Agnosia* (trastorno a causa de un defecto somatosensitivo) y *Apraxia* (trastorno de la ordenación secuencial de movimientos singulares para realizar otros combinados o maniobras, pero conservando la movilidad elemental). A menudo el proceso es tan lento que se conserva cierto grado de capacidad funcional durante muchos años (Adams y cols., 1999).

La anormalidad de los movimientos es al principio ligera, y abarca a las manos y a la cara; el paciente se considera a sí mismo inquieto o "nervioso". Los signos tempranos son lentitud de los movimientos de los dedos y las manos, tasa reducida de golpeteo con los dedos y dificultades para efectuar una sucesión de movimientos con las manos. Gradualmente, estas anomalías se van volviendo más pronunciadas hasta que se afecta toda la musculatura. Aumenta la frecuencia del parpadeo (lo contrario a lo que ocurre en el parkinsonismo), se tiene un control deficiente de la lengua (no puede conservarse la lengua fuera de la boca) y también del diafragma. En la etapa avanzada de la enfermedad el paciente está quieto rara vez, más de unos cuantos segundos. Los movimientos son más lentos que las sacudidas bruscas y los lapsos posturales de la corea de Sydenham, y abarcan a muchos más músculos. Tienden a reaparecer en patrones estereotipados, pero no tanto como los tics. En los casos más avanzados adquieren una cualidad atetolde o distónica (hiperquinesias perezosas involuntarias sobre todo en los segmentos distales de las extremidades). El tono muscular suele estar disminuido hasta la parte tardía de la enfermedad, en la cual puede haber cierto grado de rigidez, temblor y bradicinesia (término que indica lentitud, más que falta de los movimientos). Los reflejos tendinosos están intensificados en una parte de los pacientes, pero sólo unos cuantos tienen signo de Babinski (prueba de reflejo tendinoso que evoca una de las reacciones reflejas al estimular la planta del pie). En los individuos sanos, la fricción del borde externo del pie desencadena una flexión plantar tónica de los dedos. Los movimientos voluntarios se inician y ejecutan con más lentitud que en condiciones normales, pero no hay debilidad ni *ataxia real* (trastorno de la marcha); la ataxia sensitiva se debe a la posición de las articulaciones en un sentido muscular debido a la interrupción de las fibras nerviosas aferentes en los nervios periféricos, las raíces posteriores, lesión de ambos lóbulos

parietales, etc., y cuyo efecto priva al paciente de la percepción de la posición que tiene su extremidad, con sentido de desequilibrio. Cuando se suspende en el espacio a un paciente de Huntington, las extremidades superiores adoptan una postura en flexión y las piernas en extensión, lo que se considera expresivo del síndrome estriatal (Denny y Brown, 1962). Se encuentra trastornada también la función oculomotora en la mayoría de los pacientes (Leigh y cols., 1983; Lasker y cols., 1987).

La relación de los síntomas coréicos con los mentales "no se rige por una regla general" (Adams y cols., 1999)

Más a menudo, los síntomas mentales preceden a la corea, pero pueden acompañar a la iniciación de ésta u ocurrir después de ella, en ocasiones por muchos años de diferencia. Incluso hay datos en los que el trastorno de los movimientos existió durante 10 a 30 años sin cambios mentales en los pacientes con la anomalía génica de la HD (Britton y cols., 1995). Después de 10 a 15 años, la mayoría de los pacientes se deterioran hasta llegar a un estado vegetativo, incapaces de adoptar la bipedación además de comer poco, hasta que sobreviene una neumonía (o alguna otra complicación inherente del padecimiento) que terminan con su vida. En esta etapa final puede aparecer amiotrofia. Es notable la tasa elevada de suicidios en los pacientes con HD (Shoenfeld y cols, 1984), o como señaló el mismo Huntington, hay una incidencia elevada de traumatismos; el hematoma subdural crónico es un hallazgo frecuente durante la necropsia (Adams y cols., 1999).

Los primeros signos de la enfermedad pueden aparecer durante la infancia, antes de la pubertad (incluso antes de los cuatro años de edad), y se han descrito varias series de éstos casos (Farrer y Coneally, 1987; Van Dijk y Cols., 1986). El deterioro mental a esta edad temprana se acompaña más a menudo de *ataxia cerebelosa*, problemas de conducta, convulsiones, *bradicinesia*, rigidez y *distonia*, que de la misma corea (Byers y cols., 1973); sin embargo, la forma rígida de la enfermedad (variante de Westphal) ocurre también en adultos. La declinación funcional es mucho más rápida en los niños que en los adultos (Young y cols., 1986).

La iniciación más temprana en las generaciones sucesivas (*anticipación*) se define adecuadamente desde los inicios del estudio. Chandler y cols. (1960) demostraron que la demencia es en general más grave en los casos de iniciación temprana (15 a 40 años) que los casos tardíos (55 a 60). Como ya se mencionó, los casos de iniciación temprana son

los que tienen las repeticiones de CAG más prolongadas. Más aún, en los pacientes adultos con iniciación temprana de la enfermedad, el trastorno emocional tiende a ser prominente al principio, y precede a la corea y a la pérdida intelectual por muchos años. En el caso de la iniciación tardía, los movimientos coreiformes y la demencia progresiva son más a menudo los componentes iniciales y tienen su principio casi a la misma edad. (Adams y cols., 1999).

IX ANEXO B

↻ ESTRÉS OXIDATIVO ↻

I) RADICALES LIBRES

Un radical libre (RL) ha sido definido como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, y que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical:

$X \rightarrow e^- + X^{\cdot+}$ Radical formado por la pérdida de un electrón de un no radical

$Y + e^- \rightarrow Y^{\cdot-}$ Radical formado por la ganancia de un electrón de un no radical

(Halliwell y Gutteridge, 1989).

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula, y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente "no radical". Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable (Zentella y cols., 1994), mientras que por otra parte, en términos de daño biológico, *Reactividad* no es lo mismo que *Toxicidad* (McCord, 1992).

Las principales funciones de los RL en sistemas biológicos son: Como promotores de especies ferro, oxidación del etanol por RL, reducción de ribonucleótidos, reacciones de oxidación, carboxilación e hidroxilación, fagocitosis, actividad de peroxidasa y NADH oxidasa, maduración y respuesta al daño en tejidos vegetales, producción de eicosanoides, etc. Por ejemplo, los linfocitos y los fibroblastos constantemente generan pequeñas cantidades de radicales superóxido como reguladores de crecimiento. Los RL también están presentes para la regulación controlada de los mecanismos celulares normales y el control de reacciones enzimáticas (por ejemplo, ribonucleósido difosfato reductasa, citocromo P-450 y ciclo-oxygenasa), o bien, pueden ser productos de reacciones catalizadas enzimáticamente (tales como las catalizadas por la xantina oxidasa) (Halliwell y Gutteridge, 1989; Halliwell y Cols., 1992). Los RL están involucrados también en el

sistema inmune a través de los fagocitos en el llamado "estallido respiratorio", donde la oxidasa inicia el mecanismo de defensa (Babior, 1995; Allen, 1994), o bien, en las plantas, participando en procesos como la maduración, el envejecimiento y la respuesta al daño tisular (Zentella y cols., 1996).

Los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, y los que tienen más importancia desde el punto de vista de la biología son los derivados del oxígeno y nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados del hidrógeno y el carbono, así como los formados por los metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

Para los RL derivados del oxígeno pueden mencionarse: Los singuletes delta y sigma del oxígeno (1O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas entidades son llamadas genéricamente *Especies derivadas de oxígeno* (Halliwell y Gutteridge, 1989).

II) ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es un término colectivo que involucra no solo a los RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular de oxígeno, y que además son muy *reactivos*, como son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es un radical libre en sí, pero que está estrechamente relacionado con los RL debido a que es el principal precursor del radical hidroxilo, además del ácido hipocloroso (HClO), radicales alcóxilos ($RO\cdot$) o peróxilos ($RO_2\cdot$), entre otros que se muestran en la siguiente tabla (Gilbert y Colton 1999).

Radicales	No-Radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo ($\cdot OH$)	Acido hipocloroso (HClO)
Peroxilo ($RO_2\cdot$)	Ozono (O_3)
Alcoxilo ($RO\cdot$)	Oxígeno singulete ($O^1\Delta g$)
Hidroperoxilo ($HO_2\cdot$)	Peroxinitrito ($ONOO\cdot$)

Figura 1B (Gilbert, 1999).

III) ESPECIES REACTIVAS DEL NITROGENO (RNS)

Otro grupo importante son las *especies reactivas de nitrógeno* (RNS, por sus siglas en inglés), que aunque no todos sean RL, son especies involucradas con la formación de los RL, tales como el radical óxido nítrico (NO^\cdot), Ión nitronio (NO_2^+), bióxido de nitrógeno (NO_2), Ión peroxinitrito (ONOO^\cdot), etc. (Pogrebnyaya y cols., 1975). De ellos, uno de los más destacados es el NO^\cdot , que está involucrado en numerosos procesos biológicos, que entre otras funciones va desde el control de la presión sanguínea (factor de relajación de vasos y músculo liso) (Furchgott y Vanhoutte, 1989), hasta la neurotransmisión (el NO es un importante modulador neuronal) (Garthwaite y cols., 1988), siendo también un importante componente del sistema inmune en la vía fagocítica (Moncada y cols., 1991; Ignarro, 1990; Feldman y cols., 1993), y como recientemente se ha demostrado, es además un regulador de caspasas para la apoptosis (Peter y cols., 2002).

En la tabla periódica de los elementos, todos los metales de la primera fila (exceptuando al Zn) en el bloque *d* contienen electrones desapareados cuando se encuentran en alguna de sus valencias, de manera que pueden contribuir a la formación de RL biológicamente nocivos, siendo los metales más importantes el Mn, el Fe, el Co, el Ni y el Cu. Tales elementos además están presentes en todas las células de seres humanos. Con frecuencia se ubican en el centro activo de proteínas con o sin actividad enzimática (Zentella y cols., 1996).

Por otra parte cuando, por alguna razón, aumenta la producción de ROS y RNS en el organismo, y la capacidad de las defensas antioxidantes endógenas resulta ser insuficiente, se establece la situación conocida como *Estrés oxidativo* (figura IA en la cual existe riesgo de daño celular severo y que puede conducir a la muerte celular. Cualquier situación patológica que altere la actividad redox, si incrementa el estrés oxidativo o modifica las defensas antioxidantes, puede conducir a un daño progresivo de la membrana celular y del tejido.

iii) DAÑO OXIDATIVO

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, así como el producto de su dismutación, no son muy citotóxicos *per se*, su reactividad puede ser amplificada *in vitro* por interacciones con componentes específicos, así como con iones de metales de transición, ciertas proteínas hemo y óxido nítrico. Los factores controladores de liberación endógena de radicales libres durante el daño al tejido incluyen:

- (i) Reclutamiento fagocítico y activación en los sitios de daño.
- (ii) Activación de enzimas productoras de superóxido.
- (iii) Interrupción del transporte mitocondrial de electrones; por ejemplo, durante la isquemia, permitiendo un escape de electrones durante la reperfusión de oxígeno.

Las especies reactivas son importantes para funciones biológicas:

Enzimas Radicales:

Ribonucleótido reductasa

Cobalamina (Vit. B12)

Especies reactivas de oxígeno:

$O_2^{\cdot -}$ como factor quimiotáctico

$\cdot OH$ como inhibidor de citocinas y factores quimiotácticos

H_2O_2 favoreciendo la adherencia a endotelio, estimulando la síntesis de quimocinas (MIP-1 α por macrófagos)

Especies reactivas de nitrógeno:

ON^{\cdot} down-regulation de moléculas de adhesión

(bajo ciertas condiciones), en parte por disminución de la activación de $NF\kappa-B$

Tanto ROS como RNS estimulan la producción de IL-8 por fibroblastos y células epiteliales

Figura 2B (Halliwell y Gutteridge, 2000)

ESTRES OXIDATIVO

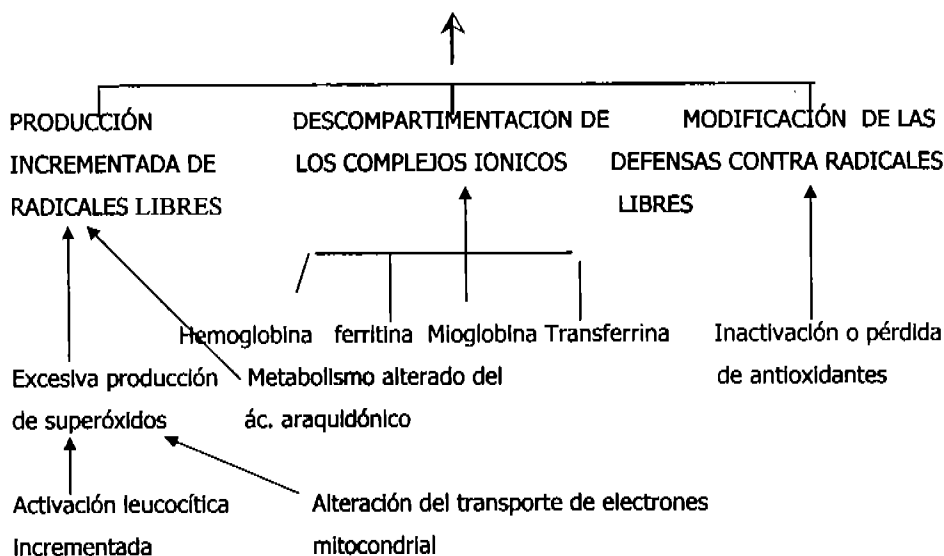
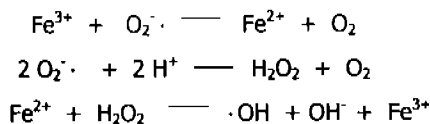


Figura 3B Contribuciones de estados patológicos al estrés oxidativo (Hernandez Luis 2000)

Los iones hierro o cobre catalizan la conversión del radical superóxido a especies tóxicas y altamente reactivas, a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Rice-Evans y Burdon, 1993):



La alta reactividad del radical hidroxilo causa que éste reaccione en un grado limitado de difusión, y propicia su reacción con las primeras moléculas con las cuales entra en contacto (dentro de 14Å después de 10^{-6} s). En consecuencia, la especie radical es capaz de producir daño a ácidos grasos poliinsaturados de las cadenas de lípidos, a proteínas, a ácidos nucleicos y a carbohidratos (Rice y Burdon, 1993).

Todas las cadenas laterales de aminoácidos constituyentes de proteínas son susceptibles al ataque de radicales libres, pero algunas son más vulnerables que otras. Así, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres puede inducir cambios estructurales terciarios como consecuencia de modificaciones individuales a las cadenas laterales de aminoácidos. Así como la estructura secundaria es estabilizada por enlaces de hidrógeno entre grupos peptídicos, las interacciones de especies radicales con el esqueleto del polipéptido y la interferencia con grupos funcionales del péptido enlazados pueden causar modificaciones estructurales secundarias. Los desórdenes de la estructura secundaria pueden ocurrir también bajo ciertas condiciones de ataque de RL al carbono- α del enlace peptídico (Rice y Burdon, 1993).

La generación de radicales en sitios inapropiados puede conducir a la destrucción de proteínas, ya que ellas también son blanco crítico para el ataque por RL, tanto intracelular como extracelularmente. Las proteínas pueden ser dañadas directamente, por interacciones específicas de RL con aminoácidos particularmente susceptibles, o pueden ser modificadas por los productos aldehídicos de la lipoperoxidación u oxidación de monosacáridos. Algunos constituyentes amino-acil cruciales para la función de proteínas, son particularmente vulnerables al daño por RL.

Las proteínas también son particularmente susceptibles al ataque de intermediarios de RL de lipoperoxidación, radicales alcoxil (LO^*) y peroxil (LOO^*). Estos pueden reaccionar con proteínas estrechamente asociadas con peroxidantes lipídicos. El daño a las proteínas de transporte de membrana afecta la homeostasis, conduciendo a una acumulación de calcio. Consecuentemente, el potencial de activación de fosfolipasas, proteasas, o de acumulación de calcio mitocondrial, puede llevar a la extensión del daño de la membrana, deterioro celular y amplificación de la lesión inicial.

Los derivados carbonilos, como los productos de la oxidación a membranas, pueden interactuar con grupos amino en cadenas laterales de aminoácidos en proteínas (Fig. 4B), alterando así su carga y su naturaleza (Rice y Burdon, 1993):

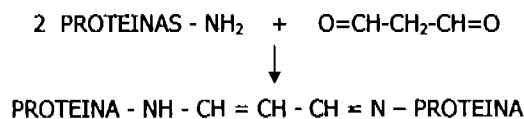


Fig. 4B. Formación de bases de Schiff

liiii) PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales ferrilo de proteína hemo y radicales hidroxilo, pueden ser mediadores importantes de daño celular y extracelular por destrucción de membranas, lípidos, lipoproteínas o alteración de sistemas enzimáticos críticos, proteínas, canales iónicos, o en el compromiso de la función celular, el estado antioxidante, y la consecuente amplificación de la lesión inicial.

Cuando un RL reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros RL ya que induce una reacción en cadena que amplifica el fenómeno miles de veces. Tal es el caso de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en la que, aunque el RL inicial produce sólo efectos locales, el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa producen RL lipídicos que pueden tener efectos a distancia del sitio donde se formó el primer RL. Esto puede inducir cambios en las características de la permeabilidad de la membrana y en la capacidad de mantener los gradientes iónicos transmembranales, así como alterar la fluidez lipídica y modificar las interacciones lípido-proteína, ocasionando finalmente un daño en la función celular.

El radical libre iniciador, que puede ser el radical hidroxilo, remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos poliinsaturados. Esto conduce a que un electrón quede desapareado en el carbono de donde salió el hidrógeno, creando con ello un radical de ácido graso. Este último realiza un rearrreglo molecular interno y forma un dieno conjugado, que a su vez reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical lipoperoxilo capaz de sustraer un hidrógeno del ácido graso vecino para formar el hidroperóxido y continuar la reacción en cadena hasta que eventualmente reaccionen dos radicales libres y con ello se llegue a la terminación del proceso.

La peroxidación lipídica puede ser iniciada por un radical libre primario, el cual es suficientemente reactivo para extraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno reactivo de un ácido graso insaturado. La formación de las especies iniciadoras se acompaña de un reacomodo del enlace que resulta en la estabilización para la formación del dieno conjugado. El radical lipídico toma oxígeno para formar el radical peroxilo. Los radicales peroxilo pueden, a su vez, combinarse con otros, o pueden atacar proteínas de

membrana; los radicales peroxilo también son capaces de abstraer hidrógeno de las cadenas de ácidos grasos adyacentes en una membrana y así propagar la reacción en cadena de lipoperoxidación. Por consiguiente, la sola iniciación del evento puede resultar en la conversión de un vasto número de cadenas de ácidos grasos en monohidroperóxidos de lípidos.

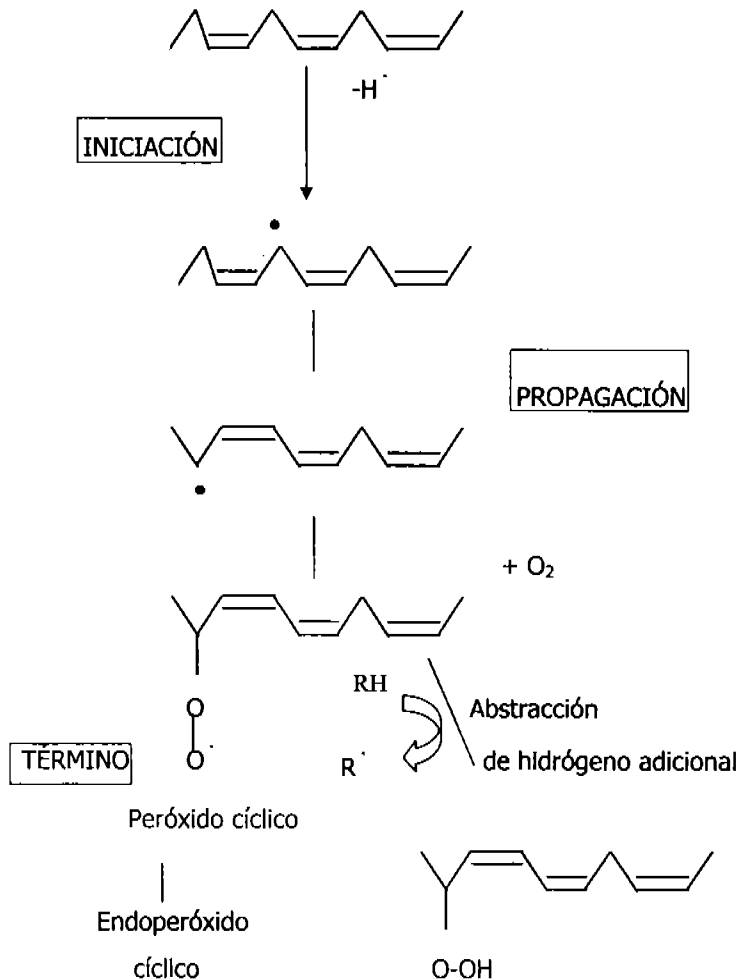


Fig 5B Iniciación y propagación de la peroxidación lipídica por radicales libres

Un paso alterno en el proceso de la lipoperoxidación es a partir del lipoperoxilo, cuando se forman los peróxidos cíclicos, los que pueden, por un lado, conducir a la formación de endoperoxidos cíclicos por la acción de la prostaglandina endoperoxido sintetasa (ciclooxigenasa), y con ésto se abre la posibilidad ya sea de dar lugar a prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, o bien de continuar hacia la vía de la degradación para dar lugar a la formación del malondialdehído (MDA) y otros productos terminales como son varios aldehídos, algunos hidrocarburos como el etano y el pentano, y otros residuos orgánicos. Estas sustancias pueden difundirse a cierta distancia del sitio de producción y originar edema celular y cambiar la permeabilidad vascular, producir inflamación y quimiotaxis. Además algunos pueden cambiar la actividad de la fosfolipasa e inducir la salida del ácido araquidónico, y con ello conducir a la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, algunos de los cuales actúan como mediadores de la Inflamación. De esta manera, la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana, al ser responsable de la pérdida de la fluidez, altera las funciones secretoras y los gradientes transmembranales de la membrana plasmática y las de los orgánulos celulares (Zentella y cols., 1994).

Los hidropéroxidos de lípidos son moléculas muy estables bajo condiciones fisiológicas, pero su descomposición es catalizada por metales de transición o complejos hemo-proteína, formando radicales alcoxil y peroxil, los cuales pueden re-iniciar el procesos y amplificar los eventos iniciales. Tanto el Fe(II) como el Fe(III) son catalizadores efectivos para la degradación de hidroperoxido.

Los complejos de hierro reducido reaccionan con hidroperoxidos lipídicos (LOOH) para dar radicales alcoxil (LO[·]):



Un punto esencial de la lipoperoxidación es que los ácidos grasos no saturados, al ser degradados por este mecanismo, conducen, ya sea de una manera directa o indirecta, a la obtención de MDA como producto final, el cual es extremadamente reactivo con grupos amino provenientes de proteínas, y generar así bases de Schiff que se pueden identificar por sus características de exhibir fluorescencia. La lipoperoxidación aumenta la

rigidez de la membrana y ésta puede disminuir la presencia de enzimas unidas a membrana y de receptores hormonales, por lo que este fenómeno se ha identificado como el de mayor importancia en el daño membranal pues altera las propiedades fisiológicas, ya sea de fluidez, permeabilidad y transporte de la misma.

MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

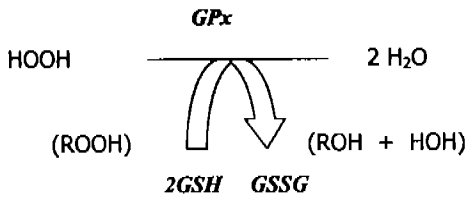
Dentro de las células existen sistemas protectores que evitan el incremento excesivo de especies oxidantes indeseables. Dentro de estos sistemas hay tres enzimas que son la piedra angular de esta protección: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

La SOD convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno. La SOD mitocondrial es dependiente de manganeso y la SOD citosólica tiene como cofactores al cobre y al zinc. La GPx y la glutatión reductasa constituyen el segundo gran sistema antioxidante celular; la GPx, enzima citosólica cuyo cofactor es el selenio, transforma al peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y participan en la reacción dos moléculas de glutatión reducido (GSH) que ceden dos hidrógenos, formando entre ellas un enlace disulfuro (GSSH). El glutatión se regenera mediante la glutatión reductasa en presencia de NADPH. Finalmente, la catalasa, enzima localizada principalmente en los peroxisomas, destruye al peróxido de hidrógeno por dismutación.

Otro tipo de protección la brindan las moléculas capaces de atrapar y eliminar a los radicales libres; entre ellas están el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina; sin embargo, la acción de éstas moléculas es inespecífica y su eficacia a las concentraciones normales a las que se encuentran no es muy alta (Zentella y cols. 1994). También las vitaminas E y C ejercen una protección complementaria: la vitamina E reacciona con los RL formando un radical tocoferilo que, por ser estable, suspende la cadena de reacciones. La vitamina C reacciona con el radical tocoferilo, regenerando la vitamina E y quedando como radical ascorbilo, también muy estable. Los flavonoides, familia de polifenoles de origen vegetal, son también moléculas antioxidantes. En cuanto al β -caroteno, éste puede inactivar

cientos de moléculas de oxígeno singlete mediante un mecanismo en el cual la energía del oxígeno singlete se utiliza en la conversión de la formación del β -caroteno al isómero *trans* y viceversa.

Las peroxidasas que contienen selenio comprenden una familia de enzimas, en la cual existen cuatro tipos: la clásica, la plasmática, la fosfolípido hidroperóxido específica y la gastrointestinal. La glutatión peroxidasa clásica (cGpx ó GPx-1) reduce peróxido de hidrógeno por el tripéptido GSH, catalizando la siguiente reacción:



La enzima es usada para la reducción de peróxidos orgánicos, incluyendo los peróxidos de ácidos grasos libres y otros lípidos. Aparentemente, los peróxidos de ácidos grasos esterificados no son reconocidos por la enzima. La actividad de GPx resulta en la conversión de dos moléculas de glutatión (GSH) al dímero glutatión (GSSG). La cGPx, de forma similar a las otras glutatión peroxidasas, contiene una triada catalítica que consiste en selenocisteína, glutamina y triptofano. La GPx consiste de cuatro subunidades protéicas, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio en su sitio activo, formando selenocisteína. El grupo selenol de la selenocisteína es activado por un enlace de un hidrógeno para reaccionar con peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos solubles. La GPx tiene la peculiaridad de no generar radicales libres al reducir hidroperóxidos. Existe evidencia de que ninguna otra selenoproteína puede proteger a ratones contra el estrés oxidativo tan eficientemente como la cGPx (Haan y cols., 1988; Cheng y cols., 1988).

La glutatión peroxidasa plasmática (pGPx) es expresada como una preproteína equipada con una secuencia líder típica, dirigiendo la enzima al espacio extracelular. La especificidad de pGPx por hidroperóxidos parece ser similar a la especificidad que expresa cGPx, pero se ha reportado que también reduce grupos hidroperóxido de lípidos complejos (Yamamoto y Takahashi, 1993). En 1994, Björnstedt y cols., identificaron a la tioredoxina y la glutaredoxina como substratos alternativos, ya que una comparación estructural sugiere que enlaza menos firmemente al glutatión. Extracelularmente, el GSH se

encuentra presente por debajo del rango micromolar. Por la escasez de sustratos extracelulares para pGPx, ésta no puede ser considerada como un antioxidante eficiente, pero puede representar un sensor redox extracelular relevante para la regulación de las respuestas inflamatorias. Se ha implicado a la cantidad de peróxido extracelular en la regulación de la biosíntesis de prostaglandinas. La 5-lipooxigenasa, enzima clave para la biosíntesis de leucotrienos, solo necesita pequeñas cantidades de peróxido para activarse. La formación de lípidos proinflamatorios mediadores puede depender del peróxido previamente liberado por fagocitos activados. Así, esta peroxidasa de amplio espectro puede prevenir la amplificación de señales de estímulos inflamatorios irrelevantes (Brigellius-Flohe, 1999).

Otro miembro de la familia es la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa (PHGPx); ésta reduce grupos hidroperóxido de lípidos complejos integrados en las membranas celulares, así que es la defensa primaria contra el daño oxidativo de membrana. Reduce toda clase de hidroperóxidos desde H_2O_2 a hidroperóxidos de fosfatidilcolina e hidroperóxidos de ésteres de colesterol en lipoproteínas (Ursini y cols., 1982; Ursini y cols., 1985; Ursini y Bindoli, 1987).

Los radicales peróxido, generados por adición de oxígeno molecular a radicales alquilo, reaccionan rápidamente con tocoferoles para generar alquilo-hidroperóxidos, los cuales son sustratos de PHGPx (Hoekstra, 1975; Diplock, 1978).

Otra especialista de la familia Gpx es la gastrointestinal (GI-GPx), la cual se encuentra en endotelio epitelial del tracto intestinal, desde esófago hasta colon distal de la rata; en humanos también se encuentra en hígado. Se ha propuesto que la GI-GPx protege contra los hidroperóxidos contenidos en los alimentos o los formados por las células intestinales, o bien los formados en hígado luego de la absorción de xenobióticos (Brigellius-Flohe, 1999).

☪ BIBLIOGRAFÍA ☪

• X

- Adams R.D., Maurice V., Ropper A.H. (1999) Principios de Neurología. McGraw-Hill 6a edición Interamericana editores : Capítulos: 4, 37.
- Albakri, Q.A., Stuehr, D.J. (1996). Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric-oxide- mediated changes in heme incertion and availabilly, *J. Biol. Chem.* **271**:5414-5421.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (2002) Biología Molecular de la Célula. 3ª edición omega, pgs: 581-583.
- Anagli, J., Hofmann, F., Quadroni, M., Vorherr, T., Carafoll, E. (1995) The calmodulin-binding domain of the inducible (macrophage) nitric oxide synthase, *Eur. J. Biochem.* **233**: 701-708.
- Anbar, M., Taube, H. (1954) Interaction of nitrous acid with hydrogen peroxyde and with water. *J. Am. Chem. Soc.* **76**: 6243-6247.
- Aguado C.R., Francis Turner L., Díaz C.M., Antunez I. (2000) Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem. International*, **37**: 53-60.
- Akerboom T.P.M., Sies H. (1981) Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods. Enzymol.* **77**: 373-382.
- Albin R.L., Young A.B., Penney J. B. (1989) The funcional anatomy of basal ganglia disorders. *T.I.N.S.* **12**: 366-370.

- Alexander G. E. and DeLong M. R. (1992) Mechanism of the Initiation and control of movement. *Clinical Neurobiol.* 2nd ed. Philadelphia, Saunders, chap 21:285-308.
- Allen R. C. (1994) Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. *Environ Health perspect.* 102: 201-208.
- Aronin N., Cooper P.E., Lorenz L.J. Bird E.D., Sagar S.M., Leeman S.E., Martin J.B. (1983) Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington disease. *Ann. Neurol.* 13: 519-526.
- Augusto, O., Gatti, R., Radl, R. (1994) Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinosydnonimine N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal independent formation of free radical intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 118-125.
- Awasthi Y.C., Beutler E., Srivastava S.K. (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 250:5144-5149.
- Aykac-Toker, G., Bulgurcuoglu, S. Kocak-Toker, N. (2001) Effect of peroxynitrite on glutaredoxin. *Hum. Exp. Toxicol.* 20: 373-376.
- Babior B. M. (1995) Activation of the respiratory burst oxidase. *Environ. Health. Perspect.* Jan 2: 55-60.
- Barlett, D., Church, D. Bounds, P., Koppenol, W. (1995) The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 85-90.
- Barrera, D., Maldonado, P., Medina, O., Hernandez, R., Ibarra, M., Pedraza, J. (2003) HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K₂Cr₂O₇. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1390-1397.

- Beal M. Flint, Kowall N. E., Ellison D.W., Mazurek M.F., Swartz Kenton J., Martin J.B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* **321**: 168-171.
- Beal M. F., Mazurek M.F. (1986) Neuropeptide Y is increased in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **20**: 547-551.
- Beal M. F., Bird E.D., Langlais P.J., Martin J.B. (1984) Somatostatin is increased in the nucleus accumbens Huntington's disease. *Neurology* **34**: 663-666.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1620-1624.
- Beckman J.S., Crow J.P. (1993) Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 330-334.
- Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**: 1424-1437.
- Behan W.M.H., McDonald M., Darlinton L.G. and Stone T.W. (1999) Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* **128**:1754-1760.
- Bender D.A., and McCreanor, G.M. (1989a) The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **717**: 56-60.
- Bender D.A. (1989b) The kynurenine pathway of tryptophan metabolism in quinolinic acid and the kynurenines. *C.R.C. Press. Fl.* 3-38.
- Bernheimer H., Hanykiewicz O. (1973) Brain amines in Huntington's chorea. *Adv. Neurol.* **1**: 525-528.

- Bird E.D., Iversen L.L. (1974) Huntington's chorea : postmortem measurement of glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase and dopamine in basal ganglia. *Brain* **97**:457-560.
- Björnstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B., Hollmgren A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **269**: 382-384.
- Block F., Kunkel M. and Schwarcz M. (1993) Quinolinic acid lesion of the stratum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci. Lett.* **149**: 126-128.
- Bohle, S., Hansert, B. (1997) O-atom scrambling in the aqueous isomerization of pernitrous acid. *Nitric oxide: Biology and Chemistry* **1**:502-506.
- Bordelon Y.M., Chesselet M-F., Nelson D., Welsh F., Erecinska M. (1997) Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.* **69** : 1629-1639.
- Brackenridge C. J. (1971) The relation of type of initial symptom and line of transmission to ages at onset and death in Huntington's disease. *Clinic. Genet.* **2**: 287-297.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. and Snyder, S. H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* **351**: 714-718.
- Bredt, D.S., Ferris, C.D., and Snyder S.H. (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent, protein kinase, protein kinase C. and Calcium/calmodulin protein kinase : identification flavin of calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.* **267**: 10976-10981.

- Brigelius-Flohé R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 951-965.
- Britton J.W., Uitti R.J. Ahlskog J.E. (1995) Hereditary late-onset chorea with out significant dementia. *Neurology* **45** : 443-452.
- Bruyn GW, von Wolfereen WJ. (1973) Pathogenesis of Huntington's chorea. *Lancet* **1** (7816):1382.
- Bruyn GW. (1966) Biochemical studies In Huntington's chorea. 3. Aminoacids In serum and urine. *Psychiatr. Neurol. Neurochim.* **69** : 139-42.
- Bruyn G.W., Bots G., and Dom R. (1983) Huntington's chorea. *J. Med. Genet.* **20**:76-80.
- Bruyn R.P.M., Stoof J.C. (1990) The quinolinic acid hypothesis In Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* **95**: 29-38.
- Buglanl O., Tabaton M., Cammarata S. (1984) Huntington disease: survival of large striatal neurons In the rigid variant. *Ann. Neurol.* **15** :154-156.
- Byers R.K., Gilles F.H., Fung C. (1973) Huntington's disease in children: Neuropathologic study of four cases. *Neurology.* **23**: 561-566.
- Cabrera J., Reiter R.J., Tan D-X, Qi W. Sainz R.M., Mayo J.C., García J.J., Kim S.J., El-Sokkary G. (2000) Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. *Neuropharmacol.* **39**: 507-514.
- Chan, P.H., Yang, G.Y., Chen, S.F., S.F., Carlson, E., Epstein, C.J. (1991) Cold-induced brain edema and infraction are reduced in transgenic mice overexpressing Cu,Zn-superoxide dismutase. *Ann. Neurol.* **29**: 482-486.

- Chandler J.H., Reed T.E., De Jong R.N. (1960) Huntington's chorea In Michigan. *Neurology* **10**: 148-152.
- Cheng W., Ho Y., Valentine B., Ross D., Combs G. Lei X. (1988) Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J.Nutr.* **128**: 1070-1076.
- Cho, H.J., Martin, E., Xie Q.W., Sassa S. and Nathan C. (1995) Inducible oxide nitric synthase: Identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 11514-11518.
- Coddington, J.W., Hurst, J.K., Lyman, S.V. (1999) Hydroxyl radical formation during peroxynitrous acid decomposition. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 2438-2443.
- Conneally P.M. (1984) Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am. J. Hum. Genet.* **36**: 506-526.
- Cotton F.A., Wilkinson G. (2001) Química Inorgánica Avanzada. Limusa Noriega Editores, México.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli B., O'connor M., Salman A.L., Sczabo C. (1998) Effect of L-buthionine-(S-R) sulfoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite and endotoxic shock-induced vascular failure. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 525-537.
- Davenport C.B. (1915) Huntington's chorea In relation to heredity and eugenics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1**: 283-286.
- Dawbarn D., De Quidt M.E., Emson P.C. (1985) Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurons in Huntington's disease. *Brain Res.* **340**: 251-260.

- DeJong R.N. (1973) The history of Huntington's chorea in the United States of America. *Raven. Press.*, 19-27.
- Denicola, A., Souza, J.M., Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3566-3571.
- Denny-Brown D. (1962) The basal ganglia and their relation to disorders of movement. London, Oxford University Press.
- Diplock A.T. (1978) The biological function of vitamin E and the nature of the interaction of the vitamin with selenium. *World Rev. Nutr. Diet.* **31**: 178-183.
- Douki, T., Cadet, J. (1996) Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic. Res.* **24**:369-380.
- El-Defrawy S.R., Boegman R.J., Jhamandas K., Beninger R.J. (1986) The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**: 369-375.
- Enna S.J. (1985) Biochemical and electrophysiological characteristics of mammalian GABA receptors. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 907-912.
- Farrer L.A., Conneally M. (1987) Predictability of phenotype of Huntington's disease. *Arch. Neurol.* **44** :109-114.
- Feldman P.L., Griffith, O.W., Stuehr D.J. (1993) The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News.* **71**: 26-38.
- Ferrante R.J., Kowall .W., Beal M.F., Richardson E.P., Bird E.D., Martín J.B. (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* **230**: 561-563.

- Fleury M.O., Ashley D.V. (1983) High-performance liquid chromatography analysis of amino acids in physiological fluids: on line precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* **133**: 330-335.
- Flohé L., Günzler W.A., Schock H.H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**: 132-134.
- Forloni G.L., Angeretti N., Rizzi M., Vezzani A. (1992) Chronic infusion of quinolinic acid in rat striatum: effects on discrete neuronal populations. *J. Neurol. Sci.* **108**: 129-136.
- Forno L.S., Jose C. (1973) Huntington's chorea—a pathologic study. *Adv. Neurol.* **1**: 453-457.
- Forno L.S., Norville R.L. (1979) Ultrastructure of the neostriatum in Huntington's and Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **3**:123-127.
- Forstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E. I., Kleiner, H. (1995a). Isoforms of nitric oxide synthase—properties, cellular distribution and expressional control *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1321-1332.
- Forstermann, U., Kleiner, H., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E. I., and Dun N. J., (1995b) Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types in nitric oxide (L. Ignarro y E. Murad, eds.), pp 171-186. *San Diego Academic Press.*
- Foster A.C., Miller L.P., Oldendorf W.H., Schwarcz R. (1984a) Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat. *Exp. Neurol.* **84**: 428-440

- Foster A.C., Vezzani A., French E.D.; Schwarcz R. (1984b) Kinurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* **48**: 273-278.
- Foster A.C., Whetsell W.O. Jr., Bird E.D., Schwarcz R. (1985) Quinolinic acid phosphoribyltransferase In human and rat brain: activity in Huntington's disease and in quinolinate-lesioned rat striatum. *Brain Res.* **336**: 207-214.
- Furchgott R.F. and Vanhoutte P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**: 2007-2018.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.
- Garthwaite J., Charles S., Williams C. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests roller as Intercellular messenger In the brain. *Nature* **336**: 385-388.
- Gilbert, D.L., Colton, C.A. (1999) Reactive oxygen species In biological systems. Edited by. Kluwer Academic / Plenum publishers N.Y. Cap. 1,2,3,4,8,9,10,11,13.
- Goldstein, S., Czapski, G. (1995) The reaction of NO[•] with O⁻ and HO₂: a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* **953**: 505-510.
- Graveland G.A., Williams, R.S., DiFiglia M. (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons In Huntington Disease. *Science* **227**: 770-773.
- Greenacre, S., Ischiropoulos, H. (2001) Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.* **34**: 541-581.

- Guillemin G.J., Kerr S.J., Smythe G.A., Smith D.G., Kapoor V., Armati P.J., Croitoru J., Brew B.J. (2001) Kinurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J. Neurochem.* **78**: 842-853.
- Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M. (1983) A polymorphic DNA marker, genetically linked to Huntington's disease. *Nature.* **306**: 234-240.
- Guzmán J.Nicolas, Apraku-Amoah Bismark (1999) Reactive oxygen species in biological systems, edited by Gilbert and Colton. *Kluwer/ Plenum publishers, N.Y.* pp 221-225.
- Haan J.B., Bladier C., Griffiths P., Kelner M., O'Shea R.D., Cheung N.S., Bronson R.T., Silvestro M.J., Wild S., Zheng S.S., Beart P.M., Hertzog P.J., Kola I. (1988) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx 1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **22**: 528-536.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* **23**: 1396-1397.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) Free radicals in biology and medicine. Oxford. *Clarendon Press.* 368-415.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1992) Free Radicals, antioxidants and human disease : where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* **119**: 598-620 .
- Halliwell B. (1997) What nitrates tyrosine? *FEBS Let.* **411**: 157
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2000) Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications. Cap.4.

- Halfpenny, E., Robinson, P. (1992) Pernitrous acid: the reaction between hydrogen peroxide and nitrous acid, and the properties of an intermediate product *J. Chem. Soc.* **1952**: 928-938.
- Hantraye P., Richie D., Mazlere M., 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.
- Harman D, (1993) Free radicals and age-related diseases. *C.R.C. Press. U.S.A.* 205-222.
- Harris C.A., Miranda A.F., Tanguay J.J., Boegman R.J., Beninger R.J., Jhamandas K. (1998) Modulation of striatal quinolinic neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *Br. J. Pharmacol.* **124**: 391-399.
- Hassan, H.M.(1988). Biosynthesis and regulation of superoxides dismutases. *Free Radical Biol. Med.* **5**: 377-385.
- Hausladen, A., Fridovich, I. (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* **269**: 29405-29408.
- Hayden M.R., Hopkins H.C., Macrea M. Beighton P.H. (1981) The origin of Huntington's chorea the Afrikaner population of South Africa. *S. Afr. Med. J.* **58**: 287-290.
- Hernández Luis F. (2000) "Apuntes de Toxicología". Unidad de posgrado, departamento de farmacia, Facultad de Química, UNAM.
- Heyes M.P., Markey S.P. (1988) Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. *Anal. Biochem.* **174**: 349-359.

- Heyes M.P., Rublnow D., Lane C., and Markey S.P. (1989) Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann. Neurol.* **26** : 275-277.
- Heyes M.P., Mefford I.N., Quearry B.J., Dedhia M., Lackner A. (1990a) 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., Lackner A. (1990b) Increased cerebrospinal fluid quinolinic acid, kynurenic acid and L-kynurenine in acute septicemia. *J. Neurochem.* **55**: 338-341.
- Heyes M.P., Brew B.J., Martin A., Price R. W., Salazar A.M., Siddis J.J., Yergey J.A., Mourdain M.M., Sadler A.E., Kellp J., Rublnow D., Markey S.P. (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection : relationship to clinical and neurologic status. *Ann. Neurol.* **29**: 202-209.
- Heyes M.P., Sito K. and Markey S.P. (1992a) Human macrophages convert L-Tryptophan in to the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem. J.* **283**: 633-635.
- Heyes M.P., Jourdain E.K., Lee K., Saito K., Frank J.A., Snoy P.J., Markey S.P., Gravell M. (1992b) Relationship of neurologic status in macaques infected with the simian immunodeficiency virus to cerebrospinal fluid quinolinic acid and kynurenic acid. *Brain Res.* **570**: 237-250.
- 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., Millstein S., Mouradian M.M., Pranzatelli M.R., Quearry B.J., Salazar A., Smith M., Strauss S.E., Sunderland T., Swedo S.W., Tourtellotte W.W. (1992c) Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* **115**: 1249-1273.

- Hoekstra W.G. (1975) Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed. Proc.* **34**: 2083-2089.
- Hule, R.E., Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* **18**:195-199.
- Hunt J.A., Lee J., Groves J.T. (1997) Amphiphilic peroxyxynitrite decomposition catalysts in liposomal assemblies *Chem. Biol.* **4**: 845-858.
- Ignarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M., Rogers N.E. (1993) Oxidation of Nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:8103-8107.
- Ignarro L. J. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 535-560.
- Imam S.Z., Crow J.P., Newport G.D., Islam F., Slikker Jr W., Ali S.F. (1999) Methamphetamine generates peroxyxynitrite and produces dopaminergic neurotoxicity in mice: protective effects of peroxyxynitrite decomposition catalyst. *Brain Research.* **837**: 15-21.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. Smith, C., Beckman J. (1992) Peroxyxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 431-437
- Kandel E., James H. Schwartz, Thomas M. J. (1991) Principles of neural science. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut 3a ed.
- Kiernan J.A. (2000) "Barr" El sistema nervioso humano. MacGraw-Hill Interamericana editores, 7a edición.

- Klatt , P., Pfeiffer, S., List., B.M., Lehner, D., Mayer, B. (1996) Characterization of heme-deficient neuronal of nitric-oxide syntase reveals a role for heme In subunit dimerization and binding of the aminoacid substrate and tetrahydrobiopterin *J. Biol. Chem.* **271**: 7336-7342.
- Klebl B., Ayou A., Pette D. (1998) Protein oxidation, tyrosine nitration and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, In low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett.* **422**: 381-384.
- Koppenol W., Kissiner R., Beckman, J. (1996) Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite *Methods Enzymol.* **269**: 296-302.
- Kordower J. H., Isaccson O., Emerich D.F. (1999) Cellular Delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: Is neuroprotection possible?. *Exp./ Neurol.* **159**: 4-20.
- Lange H., Thorner G., Hopf A., Schroder K.F. (1976) Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J. Neurol. Sci.* **28**: 401-25.
- Lapin I.P. (1978) Stimulant and convulsive effects of kynurenines ejected into brain ventricles in mice. *J. Eur. Neural. Transm.* **42**: 37-43.
- Lapin I.P. (1982) Convulsant action of Intracerebroventricularly administered l-kynurenine sulphate, quinolinic acid and other derivatives of succinic acid, and effects of amino acids: structure-activity relationships. *Neuropharmacol.* **21**: 1227-1233.
- Lasker A.G., Zee D.S., Hain T.C. (1987) Saccades in Huntington's disease: Initiation defects and distractibility. *Neurology* **37**: 364.

- Leigh R.J., Newman S.A. Folstein S.E. (1983) Abnormal ocular motor control in Huntington's disease. *Neurology* **33**: 1268-1273.
- Lehrman E., Molinari A., Speciale C., Szwarcz R. (2001) Immunohistochemical visualization of newly formed quinolinate in the normal and excitotoxically lesioned rat striatum. *Exp. Brain Res.* **141**: 389-397.
- Liles S.L., Davis G.D. (1969) Electrocortical effects of caudate stimulations which alter cortically induced movement. *J. Neurophysiol.* **32**: 574-582.
- Lipton, S.A., Choi, Y. B. Pan, Z.S. H. Lei, S.Z., Chen H.S., Sucher, N. J., Loscalzo J., Singel, D.J., Stamler J.S. (1993) A redox based-mechanism for the neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**: 626-632.
- Lowry O. H., Rosebrogh N.J., Farr A.L. Rondall R.J. (1951) Protein measurement with the Follin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Marletta, M.A. (1993). Nitric oxide synthase: function and mechanism. *Adv Exp. Med. Biol.* **338**: 281-284.
- Marletta, M.A. (1994b). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**: 927-930.
- Martin J.B. (1984) Huntington's disease: approaches to an old problem. *Neurol.* **34** :1059.
-
- Martin J.B. (1984) Genetic testing in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **16**: 511-518.
- Martin JB., Gusella JF. (1986) Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N. Engl. J. Med* **315**: 267-1276.
- Mazzari S., Aldinio C., Beccaro M., Toffano G., Szwarcz R. (1986) Intracerebral quinolinic acid injection in the rat: effects on dopaminergic neurons. *Brain. Res.* **380**: 309-316.

- McCord J. M. (1992) Superoxide production and human disease. *C.R.C. Press.*, 225-239.
- McGeer P.L. McGeer E.G., Fibigen H.C. (1973) Choline acetylase and glutamic acid and decarboxylase in Huntington's chorea. *Neurol* **23**: 912-916.
- MacMillan-Crow, L., Crow, J., Thompson, J. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical Tyrosine residues. *Biochemistry* **37**:1613-1622.
- McMurry (2002) Química organica. 4a edición, editorial Harper, cap. 13.
- Merenyl, G., Lind, J., Czapski, G., Goldstein S. (2000) The decomposition of peroxynitrite does not yield nitroxyl anion and singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8216-8218.
- Mihm, M., Yu, F., Carnes, C., Reiser, P., McCarthy, P., Van Wagoner, D., Bauer, J. (2001) Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* **104**: 174-180.
- Milstein, S., Katusic, Z. (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 681-684.
- Mohr, S., Stamler, J., Brune, B. (1994) Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Lett.* **348**: 223-227.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.

- Moroni F., Lombardi G., Karla V., Pellegrini D., Carassale G.L., 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.
- Muriel, P., Sandoval, G. (2000) Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and Na⁺/K⁺ATP-ase activity. *Nitric Oxide* **4**: 333-342
- Nathan, C., Xie, Q.W., (1994a) Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* **78**: 915-918.
- Nathan, C., Xie, Q.W., (1994b) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**: 13725-13728.
- Nemerof C.B., Youngblood W.W., Manberg P.J., Prange A.J., Kizer J.S. (1983) Regional brain concentrations of neuropeptides in Huntington's chorea and schizophrenia. *Science* **221**: 972-975.
- Noack H., Lindenau J., Rothe F., Asayama K., Wolf G. (1998) Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxicity mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitric stress. *Glia* **23**: 285-297.
- Norman A. B., Wyatt L. M., Hildebrand J. P., Kolmonpunporn M., Moody C. A., Lehman M. N., Sanber P. R. (1990) Sensitization of rotation behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine or kainic acid-induced striatal lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **37**: 755-759.
- Obrenovitch T.P. (2001) Quinolinic acid accumulation during neuroinflammation. Does it imply excitotoxicity? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **939**:1-10.
- Okuno E., Schmidt W., Parks D.A., Nakamura M., Schwarcz R. (1991) Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations. *J. Neurochem.* **57**: 533-540.

- Padmaja S., Squadrito G., Lemercler J., Cueto R., Pryor W. (1996) Rapid oxidation of DL-selenomethionine by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **21**: 317-324.
- Paxinos G., Watson C., (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates Second Edition Academic Press, inc., fig 22.
- Perkins M.N., Stone T.W. (1983a) Quinolinic acid: Regional variations in neural sensitivity. *Brain Res.* **259**: 172-176.
- Perkins M.N., Stone T.W. (1983b) Pharmacology and regional variations of Quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**: 551-557.
- Peter K.M., Kim Y.G., Kwon J., Hun-Taeg C., Young M.K. (2002) Regulation of caspases by nitric oxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **962**: 42-52.
- Pfeiffer, S., Schmidt, K., and Mayer, B. (2000) Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide /superoxide *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **275**: 6346-6352.
- Platenik J., Stopka P., Vejrazka M., Stipek S. (2001) Quinolinic acid-iron (II) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction. *Free Radic. Res.* **34**: 445-459.
- Pogrebnaya V.L., Usov A.P., Baranov A.V. Nesterenko A.I. (1975) Oxidation of nitric oxide by oxygen in the liquid phase, *Zh. Prikl. Khim. (English Trans.)* **48**: 1004-1007.
- Pollock, J.S., Nakane, M; Buttery, L., Martinez E; Springall, D., Pollack J. (1993) Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **265**: 1379-1387.

- Pryor W., Squadrito G. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide *Am. J. Physiol.* **268**: 699-722.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman B.A. (1991) Peroxynitrite-Induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:481-487.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, G., Navillat, M. Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free radical Biol. Med.* **30**: 463-488.
- Reynolds G.P. and Pearson S.J. (1987) Decreased glutamic acid and increased 5-hydroxytryptamine in Huntington's disease brain. *Neurosci. Lett.* **78**: 233-238.
- Rice E., Burdon R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* **32**: 71-110.
- Rios C., Santamaría A. (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* **16**:1139-1143.
- Roberts R. C., Du F., McCarthy K.E., Okuno E., Schwarcz R. (1992) Immunocytochemical localisation of kynurenine aminotransferase in the rat striatum -a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* **326**: 82-90.
- Robert J., Joynt M.O., Robert C., Griggs M.O. (1998) ganglia basals diseases, cap. 38 Lippincott company Philadelphia *Clinical. Neurol.* **3**, cap.38.
- Rodríguez-Martínez E., Camacho A., Maldonado P.D., Pedraza-Chaverri J., Santamaría D., Galván-Arzate S., Santamaría A. (2000) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* **858**: 436-439.
- Rojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H. (1995) Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **8**: 473-477.

- Rossato J.I., Ketzer L.A., Centuriao F.B., Silva S.J., Ludtke D.S.k, Zeni G., Braga A.L., Rubln M.A., Rocha J.B. (2002) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **27**: 197-303.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyamanaran, B., Barnes, S., Kirk, M., Kikuchi, M., Freeman, B.A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **269**: 26066-26075.
- Salvemini D., Zhi-Qiang W., Michael S., Mark C., and Thomas P.M. (1998) Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2659-2663.
- 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., 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., Ríos C., Solís-Hernandez F., Ordaz-Moreno J., González-Reynoso L., Altagracia M., Kravzov J. (1996) System DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacol* **35** : 23-28.
- Santamaría A., Ordaz-Moreno J., Rubio-Osorio M., Solís-Hernández F., Ríos C. (1997) Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **81**: 271-275.
- Santamaría D., Espinoza-G. V., Ríos C., Santamaría A. (1999) N^o-Nitro-L-Arginina a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-Induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices. *Neurochemical Research* **24**: 843-848.

- Santamaría A., Galván-Arzate S., Lisy V., Alf S.F., Duhart H.M., Osorio-Rico L., Rios C., St'astny F. (2001a) Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *NeuroReport* **12**(4): 871-874.
- Santamaría A., Jiménez-Capdeville M.E., Camacho A., Rodríguez-Martínez E. Flores A. and Galván-Arzate S. (2001b) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *NeuroReport* **12**: 2693-2696.
- Schwarcz R., Du F. (1991) Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **294**: 185-199.
- Schwarcz R.D. (1988) The GABA-A receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 3369-3378.
- Schwarcz R.D., Okuno E., White R.J., Bird E.D., Whetsell W.O. Jr. (1988) 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 4079-4081.
- Schwarcz R., Whetsell W.O., Mangano R.M. (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* **219**: 316-319.
- Schwarcz R., Roster A. C., French E.D., Whetsell W.O., Jr., Kohler C. (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* **35**: 19-32.
- Schwarcz R., Fuxe K., Agnati L., Hockfelt T., Coyle J. T. (1979) Rotational behavior in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: A behavioral model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res.* **170**: 485-495.

- Schwarz K., Foltz CM. (1957) Selenium as an Integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 3292-3293.
- Sennequier, N., Stuehr, D.J. (1996) Analysis of substrate induced electronic, catalytic, and structural changes in Inducible NO synthase. *Biochemistry* **35**: 5883-5892.
- Shoenfeld M., Myers R.H., Cupples L.A., Berkman B., Sax D.S., Clarck I. (1984) Increased rate of suicide among patients with Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **47**: 1283-1287.
- Shoulson I. (1984) Huntington's disease: a decade of progress. *Neurol. Clin.* **2**: 515-526.
- Siddhanta, U., Wu., C.Q., Abusoud, J.M., Zhang J.L. (1996) Heme Iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J. Biol. Chem.* **271**: 7309-7312.
- Smith R. J., Panico K.A. (1985) Automated analysis of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography. *Liquid Chrom.* **8**: 1783-1795.
- Smith C.V. (1991) Correlations and apparent contradictions in assessment of oxidant stress status in vivo. *Free Radical Biol. Med.* **10**: 217-224.
- Spokes E.G. (1981) The neurochemistry of Huntington's chorea. *Trends. Neurosci.* **4**: 115-118.
- Stadman Earl R. (2002) Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 597-604.
- Stern K., Jensen M., Kramer K. (1996) Peroxynitrite decomposition catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 8735-8736.

- Stone T.W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.* **45**: 309-379.
- Stone T. W., Burton N. R. (1988) NMDA receptors and their endogenous ligands in vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.* **30**: 333-368.
- Stone Y.W., Connick J.H. (1985) Quinolinic acid and other kynurenic acids in the central nervous system. *Neuroscience* **15**: 597-617.
- Stone Y.W., Perkins M.N. (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* **72**: 411-412.
- Stryer Lubert (1999) *Bioquímica* 4a edición, Reverte. Cap. 6 Degradación de aminoácidos y ciclo de la urea: 647
- Stuerh, D.J., Griffith, O.W., (1992) Mammalian nitric oxide synthases *Adv. Enzymol.* **65**: 278-346.
- Su, Z.Z., Blasing M.A., Fan, D., George S.E. (1995) The calmodulin-nitric oxide synthase- interaction critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation, *J. Biol. Chem.* **270**: 29117-29122.
- Susel Z., Engber T.M., Chase T.N. (1989) Behavioral evaluation of the antilexotoxic properties of MK-801: comparison with neurochemical measurements. *Neurosci. Lett.* **104**: 125-129.
- Szabó, C., Ohshima, H. (1997) DNA injury induced by peroxynitrite *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**: 323-385.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**: 971-983.

- Traylor, T., Tsuchiya, S., Byun Y.-S., Kim C. (1992) High-yield epoxidations with hydrogen peroxide and *ter*-Butyl hydroperoxide catalyzed by Iron (III) porphyrins: Heterolytic cleavage of hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 2775-2781.
- Triggs W. J., Willmore L. J. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* **42**: 676-979.
- Ursini F., Malorino M., Ferrini L., Geggolin C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* **710**: 197-211.
- Ursini F., Malorino M., Geggolin C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **839**: 62-70.
- Ursini F., Bindoll A. (1987) The role of selenium peroxidase in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **44**: 255-276.
- Van der Heyden J., Korf J. (1978) Regional levels of GABA in the brain: rapid semiautomated assay and prevention of postmortem increase by 3-mercaptopropionic acid. *J. Neurochem.* **31**: 197-203.
- Van Dijk J.G. Van Der V., Roos R. (1986) Juvenile Huntington's disease. *Hum. Genet.* **73**: 235-245.
- Vender A.D. (1975) The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. *Amino Acid Metabolism. John Wiley and Sons. U.S.A.*, 172-177.
- Vessie P.R. (1932) On the transmission of Huntington Chorea for 300 years: The Bures family group. *J. Nerv. Ment. Dis.* **76**: 553.

- Von Sattel J.P., Myers Rit, Stevens T.J.y cols. (1985) Neurologycal classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**: 559.
- Watkins J.C., Evans R.H. (1981) Excitatory aminoacid transmitter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**: 165-204.
- Wechsler D. (1994) The measurement of adult Intelligence, *3rd edition Baltimore Willams & Wilkins. Cap. 7.*
- 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.
- Xie, Q., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C. (1992) Cloning and characterization of Inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**: 225-228.
- Xie, Q.W., Nathan, C. (1994) The high-output nitric oxide pathway. Role and regulation. *J. Leukocyte Biol.* **56**: 576-582.
- Yamamoto Y. and Takahashi K. (1993) Glutathione peroxidase Isolated from plasm reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 541-545.
- Young A.B., Shoulson Y., Penney J.B. (1986) Huntington ´s disease In Venezuela: Neurologic features and functional decline. *Neurology* **36**: 244-250.
- Young A.B, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. (1988) NMDA receptor losses In putamen from patients with Huntington's disease. *Science* **241**: 981-983.
- Young A.B. (1997) Impairment of energy metabollsm and excitotoxic cell death In Huntington disease. *Rev. Neurol.* **153**: 496-498.

- Zentella M., Corona S. Saldaña Y. (1994) Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *Bol. Educ. Bloq.* **13**: 87-93.
- Zentella M., Corona S., Saldaña Y. (1996) Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol. Educ. Bloq.* **15**: 152-161.
- Zhang, X., Verge, V., Wiesenfel, H.Z., Ju, G. Bredt D., Snyder S.H; Hökfelt, T. (1993) Nitric oxide synthase-like Immunoreactivity In lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* **335**:(563-575)
- Zweier, J.L.Kuppasamy, P., Luty, G.A. (1988). Measurement of endothelial cell free radical generation : Evidence for a central mechanism of free radical injury of post ischemic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4046-4050. Muriel, P., Sandoval, G. (2000) Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and Na⁺/K⁺ATP-ase activity. *Nitric Oxide* **4**: 333-342.