



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación del posible efecto protector de la L-Carnitina  
sobre el patrón conductual motriz y las alteraciones  
morfológicas inducidas por el ácido 3-nitropropiónico en  
ratas.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

**KARINA LIZBET MENDOZA MACEDO**



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Rafael Rión Arriola.  
Vocal Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez.  
Secretario Prof. Abel Santamaría del Ángel.  
1er. Suplente Prof. María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez.  
2º. Suplente Prof. José Pedraza Chavarri.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Abel Santamaría del Ángel.

Nombre completo y firma del sustentante:

Karina Lizbet Mendoza Macedo.

## AGRADECIMIENTOS:

Agradezco principalmente a toda mi familia: a mi mamá Gloria, mi papá Jesús, mi hermanito Gerardo, mi tía Elvia y aunque ya no esta conmigo a mi mamá Martha.

Agradezco también al Dr. Abel Santamaría, por su apoyo durante toda mi estancia en su laboratorio y a la Dra. Juana Villena por ayudarme a realizar mi trabajo experimental, al igual que Nieves.

A mis amigos les agradezco por su apoyo moral y comprensión: Abigail, Adriana, Araceli, Arturo, Blanca, Daniela, Diego, Ehecatl, Martín, Moni, Monse, Natllely, Panke, Ran, Rodolfo, Sonia, Vania y Viry.

Un agradecimiento muy especial a Leo por su apoyo en todo momento, en todos los sentidos e incondicionalmente ♥.

Finalmente estoy agradecida conmigo misma por haberme sacrificado toda la carrera y haber estudiado mucho.

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Enfermedad de Huntington.**

- 1.1.1 Generalidades de Huntington.**
- 1.1.2 Alteraciones conductuales.**
- 1.1.3 Alteraciones motoras.**
- 1.1.4 Causas genéticas.**
- 1.1.5 Histopatología.**
- 1.1.6 Alteraciones en el metabolismo.**
- 1.1.7 Cambios neuroquímicos.**
- 1.1.8 Tratamientos.**
- 1.1.9 Modelos.**

#### **1.2 Ácido 3-NP**

- 1.2.1 Historia**
- 1.2.4 Metabolismo**
- 1.2.3 Toxicidad**
- 1.2.4 Modelo**

#### **1.3 L-Carnitina**

- 1.3.1 Generalidades de la L-Carnitina**
- 1.3.2 Efectos benéficos**
- 1.3.3 Metabolismo**
- 1.3.4 Farmacocinética**

### **2. HIPÓTESIS**

### **3. OBJETIVOS**

**3.1 Objetivo general.**

**3.2 Objetivos particulares.**

### **4. MATERIALES**

**4.1 Animales.**

**4.2 Reactivos.**

**4.3 Solventes y otros.**

**4.4 Equipos.**

### **5. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **6. MÉTODOS**

**6.1 Evaluación conductual.**

**6.2 Procesamiento del cerebro para la prueba histológica.**

**6.3 Tinción con hematoxilina-eosina.**

**6.4 Conteo de células**

**6.5 Taza de daño neuronal**

### **7. RESULTADOS**

**7.1 Alteraciones motoras y conductuales.**

**7.2 Alteraciones morfológicas.**

### **8. DISCUSIÓN**

### **9. CONCLUSIONES**

### **10. RECOMENDACIONES**

### **11. BIBLIOGRAFÍA**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Dado que el modelo tóxico en este trabajo constituye un modelo experimental de la enfermedad de Huntington, comenzaremos con una descripción de esta enfermedad.

#### **1.1.1 Generalidades de Huntington**

La enfermedad de Huntington (EH), es un padecimiento hereditario que se manifiesta por movimientos musculares anormales, pérdida progresiva de las funciones cognitivas y cambios de la personalidad; neuropatológicamente hay muerte celular que afecta principalmente al caudado-putamen y a la corteza cerebral. Neuroquímicamente en el caudado-putamen de los pacientes hay disminución de la concentración de los neurotransmisores acetilcolina, y del ácido-γ-amino butírico (GABA). La causa molecular de esta enfermedad es la expansión del codón CAG en el primer exón que codifica para una cadena de glutaminas de la proteína denominada huntingtina (Penney, 1982). Existe una hipótesis acerca de que en las consecuencias neuropatológicas y neuroquímicas de la EH puede estar involucrada una sobreexcitación neuronal inducida por el neurotransmisor glutamato, donde la muerte neuronal es producida por la estimulación excesiva de los receptores a aminoácidos excitadores.

En México esta enfermedad afecta a alrededor de 8000 personas.

#### **1.1.2 Alteraciones conductuales**

Al inicio de la enfermedad las características conductuales que aparecen son: irritabilidad, distanciamiento, pasividad, depresión, o mal humor. Otros síntomas que pueden aparecer son: dificultad para manejar, para aprender nuevas cosas, para recordar, para responder preguntas o tomar una decisión. Algunas personas presentan cambios en su escritura, y

mientras la enfermedad progresa se puede observar mayor dificultad en la concentración (Purdon, 1993).

### **1.1.3 Alteraciones motoras**

En algunos individuos la enfermedad puede empezar a manifestarse por movimientos descontrolados en los dedos, pies, en la cara o en el tronco. Estos movimientos son llamados corea y a menudo se intensifican cuando la persona está ansiosa; de hecho algunos pacientes la desarrollan hasta las etapas tardías de la enfermedad. Las personas con este padecimiento pueden presentar ligera torpeza, problemas con el balance, tropiezan frecuentemente, descoordinación, distonia, etc. La Corea a menudo crea serios problemas al caminar e incrementa la probabilidad de caídas (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2007).

### **1.1.4 Causas genéticas**

La EH es autosómica dominante; de esta manera, un hombre o una mujer tienen la misma probabilidad de presentar la enfermedad. El defecto genético responsable de la enfermedad es una secuencia de DNA localizada en el cromosoma 4, en donde normalmente, esta secuencia está compuesta de CAG que codifica para dar origen a la glutamina que es parte de una proteína llamada huntingtina, de la cual todavía no se conoce su función. En una persona con la EH, esta secuencia se repite varias veces, lo que produce una forma anormal de huntingtina.

Se sabe que la huntingtina es necesaria para la vida. Esto se ha demostrado gracias a estudios con ratones knockout, que no producen esta proteína, así que estos por deficiencia de la proteína mueren rápidamente. Sin embargo, aun no se sabe por que las proteínas anormales dañan partes específicas del cerebro. Una teoría es que las células de ciertas partes del cerebro son más sensibles a una proteína anormal (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2007).

### **1.1.5 Histopatología**

Dentro del cerebro tenemos los ganglios basales, que cobran gran importancia sobre todo en los movimientos de coordinación. En los ganglios basales se encuentra el estriado y dentro de éste, una región llamada caudado-putamen, es en este sitio donde la EH causa el mayor daño (Rossi, 2006). Otra parte del cerebro que se ve afectada por la enfermedad es la corteza (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2007), la cual se encarga del control de los pensamientos, la percepción y la memoria.

Se sabe que hay diferentes tipos de neuronas, clasificadas por su tamaño en: largas, medianas y pequeñas y se ha observado que la EH tiene una selectiva degeneración de las neuronas medianas.

Los investigadores han observado dos tipos de cambios en las neuronas de personas que presentan la EH: la primera es que las ramas dendríticas se comienzan a contorsionar, y la segunda sucede en etapas tardías de la enfermedad, en donde las dendritas se hinchan, se rompen o desaparecen completamente (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2007).

### **1.1.6 Alteraciones en el metabolismo**

Una posible explicación de la neurotoxicidad en la EH podría ser el déficit en la producción de energía mitocondrial. La hipótesis se basa en que las alteraciones en la fosforilación oxidativa pueden ser el déficit primario que predispone a la degeneración neuronal secundaria debida por la toxicidad del glutamato. Se ha observado un incremento en la toxicidad del glutamato después de la privación de glucosa, interrupción de la glicólisis o bloqueo de la cadena de transporte de electrones en estudios *in vitro*. En 1992, se observó por primera vez evidencia *in vivo* del daño en el metabolismo energético en la EH al observar un incremento en las concentraciones de lactato en la corteza cerebral de pacientes, al igual que una disminución en la actividad de la NADH mitocondrial (Koutouzis, 1994).

### 1.1.7 Cambios neuroquímicos

Sustancia neuroactiva	EH
GABA	Disminuye
Ach	Disminuye
Sustancia P	Disminuye
DA	No cambia
Somatostatina	Aumenta
Neuropéptido Y	Aumenta
Alteraciones dendríticas	Si

(Tajrena, 1998)

### 1.1.8 Tratamientos

En realidad no existe un tratamiento para curar la enfermedad, pero se prescriben varios medicamentos para controlar los problemas motores y conductuales.

Algunos de los medicamentos que se prescriben son antipsicóticos como el haloperidol y el clonazepam, que pueden ayudar a controlar los movimientos de corea, alucinaciones y los arranques de violencia. Para la depresión se puede prescribir flouxetina, sertralina o nortriptalina (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2007; Gatto 2002).

### 1.1.9 Modelos

Existen diferentes modelos experimentales de la EH, los cuales se basan en el mecanismo de la excitotoxicidad y en la alteración del metabolismo energético (inducidos por toxinas), así como un modelo de ratones transgénicos portadores de la expansión de repetidos de la CAG.

Los modelos de excitotoxicidad están basados en la sobreexcitación de las neuronas gracias a la estimulación propagada y continua de los receptores a aminoácidos excitadores, lo que produce alteraciones en las neuronas.

Los modelos de excitotoxicidad son:

- **Modelo del ácido kaínico:** este modelo reproduce algunas de las características histológicas, conductuales y bioquímicas de la EH, produciendo una lesión de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas, pero sin alterar las dopaminérgicas. La actividad de algunas enzimas (glutamato descarboxilasa y la colina acetil transferasa) disminuye de manera similar a la enfermedad; sin embargo, hay una disminución en los niveles de la somatostatina y del neuropéptido Y, a diferencia de la enfermedad.
- **Modelo del ácido iboténico:** este modelo está basado en la toxicidad que tiene esta molécula sobre el hipocampo. Con este modelo se puede observar una proliferación astrocítica y pérdida de fibras colinérgicas, sin alteración de las fibras dopaminérgicas. Presenta algunas alteraciones conductuales tales como: corea, distonia, y asimetría postural, pero también se presentan diferencias conductuales que no están de acuerdo con la EH.
- **Modelo del ácido quinolínico:** este modelo produce niveles disminuidos de somatostatina, neuropéptido Y, sustancia P, vasopresina, GABA y dopamina similares a los que se presentan en la EH. Conductualmente produce hiperactividad locomotora y alteraciones del aprendizaje y la memoria, pero este modelo no produce discinecias o movimientos semejantes a la corea.

Todas estas sustancias tienen una estructura similar al glutamato y son aminoácidos neuroactivos y heterocíclicos.

Modelo experimental basado en la alteración del metabolismo energético

- **Modelo del ácido 3-nitropropiónico:** la administración sistémica de esta toxina produce atrofia estriatal selectiva. Su inyección intraestriatal produce lesiones neuronales que se manifiesta con la presencia de gliosis y pérdida neuronal. Neuroquímicamente existe una disminución del GABA, la sustancia P, la somatostatina, el neuropéptido Y y la dopamina. La administración subaguda provoca movimientos lentos y postura distónica.

Modelos basados en el defecto genético de la EH.

**Ratones transgénicos:** estos animales son generados al introducir por microinyección un gen de interés a embriones fertilizados. En este caso los animales portan un fragmento de 1.9 kb del DNA que contiene el primer exón y parte del intrón del genoma de un paciente con EH. Este fragmento contiene una expansión de 113 a 156 repetidos de CAG.

Estos animales desarrollan un fenotipo de alteraciones neurológicas y neuroquímicas muy parecido a la EH.

Existen otros modelos de ratones transgénicos que expresan un DNA mutado completo, y manifiestan pérdida neuronal selectiva, gliosis y alteraciones conductuales (Yamamoto, 1999).

## 1.2 Ácido 3-nitropropiónico

### 1.2.1 Historia

En 1970, un grupo de personas en China ingirió de manera accidental un hongo en la caña de azúcar, el cual provocó una neurodegeneración dentro del estriado y problemas motrices en las personas que lo consumieron (Binienda, 2001). Los síntomas que se presentaron fueron: fiebre, dolor de cabeza, problemas gastrointestinales, somnolencia, y en la mayoría de los niños se dieron convulsiones, coma y en algunos casos hasta la muerte.

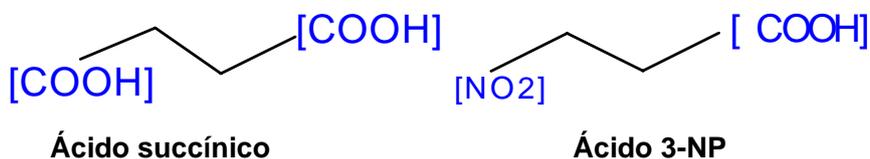
El hongo que se encontró en la caña de azúcar, era del género *Arthrimum*, y este produce la micotoxina llamada ácido 3-nitropropiónico (3-NP).

Investigadores caracterizaron las lesiones que producía el 3-NP en ratas y ratones y encontraron que después de 1-4 dosis sistémicas de 3-NP, este produce lesiones primarias en el caudado-putamen, globus pallidus, substantia nigra, hipocampo y tálamo.

Se realizaron importantes investigaciones acerca de la neurotoxicidad del 3-NP en donde se observó que se encuentra unido a un proceso de excitotoxicidad, y no sólo eso, sino que también puede incluir estrés oxidativo mediado por radicales libre (Tajrena, 1998).

### 1.2.3 Metabolismo

El 3-NP inhibe a la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) la cual es parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena de transporte de electrones durante la síntesis de ATP. El 3-NP reemplaza al sustrato original de la SDH, el ácido succínico, y se une de manera irreversible a ésta. De esta manera inhibe la actividad de la SDH tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en la síntesis de ATP.



(Tajrena, 1998).

### 1.2.4 Toxicidad

El estriado y el hipocampo contienen entradas glutamatérgicas, los cuales los predisponen a mecanismos de excitotoxicidad. Estas mismas regiones son preferencialmente vulnerables a la toxicidad resultante de la disminución de energía.

La principal hipótesis de toxicidad es que la degeneración por el déficit energético es debida a la excitotoxicidad secundaria. Se ha demostrado que esta excitotoxicidad produce neurotoxicidad en células que responden a aminoácidos excitadores, tales como las del estriado y el hipocampo ya que muchas de sus células tiene receptores para glutamato, donde la muerte neuronal se produce por la estimulación excesiva de sus receptores, particularmente del subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA).

La hipótesis acerca de la excitotoxicidad secundaria implica al potencial de membrana en las células. El 3-NP no actúa directamente en los receptores para glutamato, ni causa un aumento extracelular en las concentraciones de glutamato. Lo que provoca es un daño energético que agota el ATP, lo que causa fallas de las bombas dependientes de ATP, dando como resultado la despolarización de la célula. Como las neuronas

glutamatergicas se despolarizan continuamente, el  $Mg^{2+}$  bloquea los receptores NMDA, y de esta manera se pueden regular las concentraciones fisiológicas de glutamato para activar los receptores. La activación de los receptores NMDA lleva a un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , y esto no puede ser revertido gracias a la carencia de ATP, por lo que este incremento en la concentración de calcio guía a la neurotoxicidad.

El estriado cuenta con células GABAérgicas que son selectivamente vulnerables a la inhibición que realiza el 3-NP sobre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Otro factor que es muy importante en la neurotoxicidad del 3-NP en el estriado, es que este contiene una alta concentración de dopamina. Se sabe que la concentración de dopamina aumenta después de una dosis sistémica de 3-NP, y que ambos causan un incremento en la concentración intracelular de calcio en cultivos con astrocitos, lo que provoca la muerte de estos últimos. De esta manera, la alta concentración de dopamina en el estriado puede contribuir al daño metabólico selectivo.

Existe otro proceso por el cual el 3-NP puede causar neurotoxicidad, el estrés oxidativo, que es debido a la acción de las especies reactivas de oxígeno y por el óxido nítrico (NO). El 3-NP puede llevar al incremento en la producción de radicales libres de manera directa, por la cadena de transporte de electrones, e indirectamente, por el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$ . Este puede activar a la óxido nítrico sintetasa (NOS) que produce NO, y aumentar el daño.

Las vías por las cuales el 3-NP puede hacer daño tienen un "enlace peligroso". En primer lugar el problema está en la mitocondria por la disminución de ATP y la disfunción mitocondrial. Este daño resulta en un incremento de la producción de radicales libres. Mientras tanto la falta de ATP causa la disfunción de la bomba de iones y el canal receptor para NMDA, resultando en la acumulación intracelular de  $Ca^{2+}$ . Este  $Ca^{2+}$  intracelular induce tensión mitocondrial adicional, también conduce a la síntesis de radicales libres vía NOS y todo esto lleva a la muerte celular. Además de estos efectos secundarios, el colapso energético puede causar la muerte de la célula por la pérdida de la capacidad para producir proteínas (un proceso dependiente de ATP). Los radicales libres también pueden causar daño en la célula por ruptura de la membrana celular, mediante la destrucción de proteínas y la oxidación de DNA.

El siguiente esquema resume las vías por las cuales el 3-NP puede causar el daño:



(Tajrena, 1998).

#### 1.1.4 Modelo

El mecanismo de daño de esta toxina es la inhibición de la succinato deshidrogenasa.

Cuando el 3-NP es administrado de manera crónica y en bajas dosis a animales, se reproducen algunos aspectos de la EH, tanto neurológicamente como en el comportamiento locomotor. Primates tratados bajo este régimen presentan disfunciones motoras como corea, distonia y discinesia. En humanos las alteraciones son: distonia y corea (Tajrena, 1998).

Se ha observado que las inyecciones intraestriales de 3-NP en ratas producen lesiones neuronales dependientes de la dosis, que se manifiestan con la presencia de gliosis y pérdida neuronal. En estos mismos animales la administración subaguda provoca desarrollo de movimientos lentos y postura distónica.

Se ha reportado hipoactividad en ratas adultas tratadas durante 6 a 10 semanas con dosis sistémicas de 3-NP (Tajrena, 1998).

Basado en el análisis histológico, particularmente en la región estriatal, se han caracterizado las lesiones producidas por 3-NP en tres tipos celulares. Tipo I: lesiones

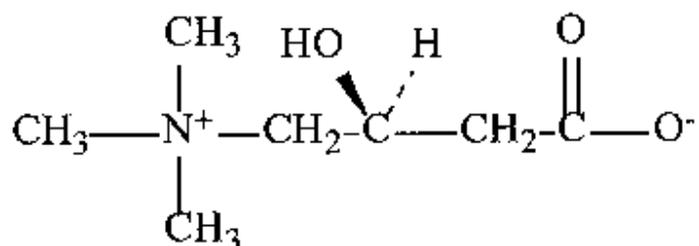
pequeñas en el estriado dorsal con pérdida neuronal, protección de las neuronas NADPH-diaforasa, con ligero daño axonal. Tipo II: gran pérdida neuronal de células del estriado dorsal con escasa diaforasa neuronal y grupos de células contraídas y empaquetadas en fibras transversales, como se observa en la patología estrial de EH. Tipo III: caracterizado por pérdida neuronal a lo largo del estriado dorsal con mínimo daño en el estriado ventral. El modelo del 3-NP produce lesiones muy similares a las de la EH, ya que por inhibición irreversible del ciclo del ácido cítrico mitocondrial, conduce a una disminución del ATP y eleva las concentraciones de lactato, además de que se han encontrado niveles altos de glutamato y daño en el metabolismo energético oxidativo (Gould, 1982).

### 1.3 L-CARNITINA

#### 1.3.1 Generalidades de la L-Carnitina.

La L-carnitina es un componente endógeno, que se puede encontrar en casi todas las células del cuerpo. Juega un papel importante en el transporte de ácidos grasos de cadena larga para introducirlos dentro de la mitocondria. Ya en su interior las cadenas de grasa participan en el proceso metabólico llamado  $\beta$ -oxidación donde estas se rompen y son transformadas en grupos Acetil CoA, y de esta forma entran al Ciclo de Krebs de donde el resultado obtenido es ATP (Alpízar, 2004).

La L-carnitina es conocida químicamente como L-3-hidroxitrimetilaminobutanoato, una sal inerte; también puede ser conocida como levocarnitina y antiguamente era llamada vitamina BT. La L-carnitina pertenece a la misma familia química que la colina y es soluble en agua. Esta representada por la siguiente estructura:



Se encuentra generalmente en productos naturales. La mayoría de las veces sólo podemos encontrar una pequeña cantidad en las plantas, con excepción del aguacate y algunos productos fermentados de la soya. La L-Carnitina es una molécula quiral. Su estereoisómero, la D-Carnitina, no tiene actividad biológica.

La L-carnitina es sintetizada en el cuerpo humano, principalmente en el hígado y los riñones, a partir de aminoácidos esenciales como la L-lisina y la L-metionina. Niacina, vitamina B<sub>6</sub> y C, y hierro están involucrados en su biosíntesis. Es un nutriente esencial (PDRhealth, 2007).

### **1.3.2 Efectos benéficos**

La L-Carnitina juega otros papeles muy importantes como es la disminución de Ácido Láctico el cual es producido y acumulado durante el ejercicio. La L-Carnitina puede considerarse como nutriente esencial para los recién nacidos ya que la biosíntesis de esta en sus organismos no se ha desarrollado completamente, por lo que una leche enriquecida con L-Carnitina ayudaría a que no tenga acumulación de ácidos grasos. La L-Carnitina también puede ser benéfica en la reducción de peso, ya que limita la acumulación de grasa en tejido y sangre, particularmente cuando la cantidad de lípidos es elevada. Utilizada en personas obesas la L-Carnitina lleva a una mayor pérdida de peso y a la reducción en los niveles de azúcar en la sangre y en la presión arterial.

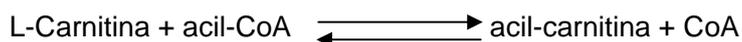
También puede brindar ayuda en los procesos inmunológicos; por ejemplo, las personas con problemas inmunológicos muestran niveles reducidos de L-Carnitina en el plasma, recuentos inferiores en linfocitos y reducciones en los niveles de L-Carnitina en leucocitos. Un suplemento con L-Carnitina produce una mejora general del sistema inmunológico promoviendo la proliferación de linfocitos y monocitos. La fertilidad masculina también se ve beneficiada por la L-Carnitina ya que en el esperma se encuentran grandes concentraciones de este compuesto y junto con su metabolito, Acetil L-Carnitina, juegan un papel decisivo en el metabolismo energético del esperma. La concentración de la L-Carnitina en el semen está íntimamente relacionada con la calidad del esperma.

En diversos estudios se ha demostrado que aquellas personas que presentan enfermedades cardiovasculares agregando a su dieta suplementos con L-Carnitina aumenta su fuerza y resistencia mejorando así su calidad de vida.

La participación de la L-Carnitina es variada; es decir, en el riñón ayuda a que la diálisis sea satisfactoria. En enfermedades como la cirrosis y la diabetes, pueden verse beneficiadas gracias a que no permite la acumulación de grasas (Rodríguez, 2004).

### 1.3.3 Metabolismo

La principal reacción biológica en la que participa la L-Carnitina puede ser descrita de la siguiente manera:



A través de la reacción anterior podemos observar que la L-Carnitina ayuda a optimizar la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria. La parte interna de la membrana mitocondrial es impermeable a los ácidos grasos de cadena larga de acil-CoA, y de esta manera los ácidos grasos no puede llegar a la parte interna de la mitocondria para la  $\beta$ -oxidación. Las cadenas largas de acil-carnitina, generadas por el acil-CoA pueden transitar por la membrana mitocondrial, regenerando la acil-CoA en la matriz mitocondrial, donde están disponibles como sustratos para la oxidación.

La segunda función de la L-Carnitina en la mitocondria, también implica la formación de acil-carnitina a partir cadenas cortas de acil-CoA. Esto ayuda a que no se acumulen las trazas metabólicas de acil-CoA, ya que estas pueden deteriorar la función celular. La transferencia de grupos acil entre la L-Carnitina y la coenzima A se encuentra en equilibrio en los tejidos de mamíferos.

En contraste con los tejidos periféricos, el nivel de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en las neuronas es relativamente bajo. La L-Carnitina ha sido detectada principalmente en forma libre en la circulación y de forma acumulada en el cerebro, debido a su habilidad para cruzar la barrera hematoencefálica. La L-Carnitina es liberada en el cerebro en forma libre, no acetilada, por endotelio microcapilar. La administración de L-Carnitina a neuronas afecta la diferenciación de éstas; en algunos casos promueve la expresión y tranferencia

de algunas proteínas a la membrana, como la proteína B-50 o neuromodulina, conocida por estar implicada en el desarrollo neuronal, la neurogénesis, la neuroplasticidad y la neurotransmisión (Brass, 2007).

### **1.3.5 Farmacocinética**

La L-Carnitina exógena es usada para el tratamiento de deficiencia de carnitina. En humanos los sitios endógenos de carnitina, que comprenden L-carnitina libre, y una gama de cadenas cortas, medianas y largas de sus ésteres, mantienen sus niveles de L-Carnitina gracias a su absorción desde la dieta, su biosíntesis dentro del cuerpo y de la reabsorción desde el filtrado glomerular. En realidad el porcentaje absorbido de los suplementos es bajo. La absorción de L-Carnitina después de la administración oral ocurre en el intestino delgado, aparentemente por difusión facilitada y transporte activo. Alrededor del 25% de L-Carnitina puede ser acetilada en la mucosa intestinal. Después de una dosis de 1-6 g, la biodisponibilidad es de 5-18%. En contraste, la biodisponibilidad de una dieta de L-carnitina es de hasta 75%. Por lo tanto, las dosis farmacológicas o suplementales de L-carnitina son absorbidas de una manera menos eficiente que las cantidades absorbidas de una dieta normal. Después de la administración intravenosa, el volumen de distribución inicial está alrededor de 0.2-0.3 L/kg. La L-Carnitina es eliminada del cuerpo principalmente por excreción urinaria. Sobre condiciones basales, el aclaramiento renal de L-Carnitina es substancialmente menor que el índice de filtración glomerular, con una excesiva reabsorción tubular que se encuentra entre 98-99%. La concentración umbral para la reabsorción tubular es de aproximadamente 40-60 mmol/L, que son similares a los niveles de L-Carnitina en plasma. Por lo tanto, el aclaramiento renal de L-Carnitina incrementa después de la administración exógena. La excreción fecal de L-Carnitina es menor al 1% total excretada. Aproximadamente 95% de la L-Carnitina filtrada es reabsorbida en personas sanas (PDRhealth, 2007; Brass, 2007).

## **2. HIPOTESIS:**

Dado su carácter como agente oxidante y precursor metabólico, la L-Carnitina protegerá contra las alteraciones morfológicas y conductuales inducidas por el 3-NP en ratas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

- Evaluar el posible efecto protector de la L-Carnitina sobre la neurotoxicidad inducida por el 3-NP en ratas.

#### **3.2 PARTICULARES**

- Determinar el efecto de una administración crónica de L-Carnitina sobre los diferentes parámetros de motricidad afectados por el 3-NP en ratas.
- Analizar el efecto de una administración crónica de L-Carnitina sobre las alteraciones morfológicas producidas por el 3-NP en diferentes regiones cerebrales.

## **4. MATERIALES**

### **4.1 ANIMALES**

Se utilizaron 8 ratas macho Wistar, entre 250-280g. proporcionadas por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

### **4.2 REACTIVOS**

Ácido 3-nitropropiónico, SIGMA.

L-Carnitina, proporcionada por el INNN, lote: 5012350

Solución isotónica salina, laboratorios PISA.

### **4.3 SOLVENTES Y OTROS**

Formaldehído

Solución de hematoxilina-eosina

### **4.4 EQUIPOS**

Equipo para medir la actividad conductual, VersaMAX Animal Monitoring System, Accuscan Instruments.

Balanza analítica, Voyager Ohaus.

Microtomo rotatorio Reichert HistoSTAT 820.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. El primer paso fue dividir en cuatro grupos a las 8 ratas y colocar a cada grupo en cajas separadas.

2. Las ratas se administraron de la siguiente manera:

Grupo	Sustancia administrada	Dosis	Días de administración
CTL	S.S.I.	0.3 ml.	1,3,5,7...29
L-CAR	L-Carnitina	100 mg/kg	1,3,5,7...29
3-NP	3-NP	7.5 mg/kg	2,4,6,8...30
TX	(L-Car)+(3-NP)	100+7.5 mg/kg	2,4,6,8...30

Como muestra la tabla anterior, las ratas fueron administradas cada tercer día, el grupo control, y el de L-Car el mismo día, y el de 3-NP y TX el mismo día.

3. La administración del 3-NP y la S.S.I. se llevó a cabo 5 min. antes de medir la conducta, pero para la L-Car la administración debe ser media hora antes; si se iba a administrar L-Car y 3-NP en la misma rata, la administración de la L-Car, de igual manera que en el caso anterior, se llevó a cabo 30 min. antes de la administración del 3-NP.

4. Después de la respectiva administración se introducen de una en una las ratas en VersaMax durante 1 hr.

5. Este proceso se llevó a cabo durante 30 días.

6. Después de 15 registros (30 días), las ratas se anestesiaron, y sometieron a una perfusión intracardiaca.
7. Finalmente se extrajo el cerebro.
8. Posteriormente se procesaron los cerebros para la prueba histológica.
9. Se realizó la tinción con hematoxilina-eosina.
10. Se tomaron fotografías de cada una de las zonas de interés, que fueron: estriado, corteza frontal e hipocampo.
11. Con las fotografías que se tomaron, se realizaron conteos de células sanas y de células dañadas.
12. Finalmente, con estos conteos se calculó la tasa de daño neuronal por cada tratamiento y región.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. El primer paso fue dividir en cuatro grupos a las 8 ratas y colocar a cada grupo en cajas separadas.

2. Las ratas se administraron de la siguiente manera:

Grupo	Sustancia administrada	Dosis	Días de administración
CTL	S.S.I.	0.3 ml.	1,3,5,7...29
L-CAR	L-Carnitina	100 mg/kg	1,3,5,7...29
3-NP	3-NP	7.5 mg/kg	2,4,6,8...30
TX	(L-Car)+(3-NP)	100+7.5 mg/kg	2,4,6,8...30

Como muestra la tabla anterior, las ratas fueron administradas cada tercer día, el grupo control, y el de L-Car el mismo día, y el de 3-NP y TX el mismo día.

3. La administración del 3-NP y la S.S.I. se llevó a cabo 5 min. antes de medir la conducta, pero para la L-Car la administración debe ser media hora antes; si se iba a administrar L-Car y 3-NP en la misma rata, la administración de la L-Car, de igual manera que en el caso anterior, se llevó a cabo 30 min. antes de la administración del 3-NP.

4. Después de la respectiva administración se introducen de una en una las ratas en VersaMax durante 1 hr.

5. Este proceso se llevó a cabo durante 30 días.

6. Después de 15 registros (30 días), las ratas se anestesiaron, y sometieron a una perfusión intracardiaca.
7. Finalmente se extrajo el cerebro.
8. Posteriormente se procesaron los cerebros para la prueba histológica.
9. Se realizó la tinción con hematoxilina-eosina.
10. Se tomaron fotografías de cada una de las zonas de interés, que fueron: estriado, corteza frontal e hipocampo.
11. Con las fotografías que se tomaron, se realizaron conteos de células sanas y de células dañadas.
12. Finalmente, con estos conteos se calculó la tasa de daño neuronal por cada tratamiento y región.

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Evaluación conductual

A cada grupo de ratas se le administró la dosis y el tratamiento correspondientes, por vía intraperitoneal. Posteriormente se introdujeron en el VersaMAX durante una hora en donde se evaluaron los siguientes patrones conductuales:

- MOVNO: número de movimientos horizontales.
- TOTDIST: distancia total recorrida (cm.).
- MOVTIME: tiempo total en que el animal estuvo deambulando (seg.).

Los datos fueron colectados, procesados y graficados para cada día de registro.

### 6.2 Procesamiento de los cerebros para pruebas histológicas

Una vez que se concluyó el tratamiento con los animales y después de haber evaluado su conducta, se procedió a realizar una disección de cerebro, que consistió en anestesiar al animal por alrededor de 5-8 min. con éter; posteriormente se abrió el cuerpo de la rata y se le realizó una perfusión intracardiaca con aproximadamente 250 ml. de S.S.I + 1 ml de heparina. Inmediatamente después, se continuó perfundiendo con una solución de paraformaldehído (10%), para que las estructuras celulares se conserven. Finalmente, se realizó la extracción del cerebro.

### FIJACIÓN

Una vez extraído el cerebro se procedió a la Fijación del mismo, lo cual tiene varias finalidades:

1. Conservar los tejidos de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado *in vivo*.
2. Aumentar la dureza del tejido para facilitar la preparación de finas películas o laminillas.

3. Destruir bacterias y gérmenes que pudieran encontrarse en ellos.
4. Interrumpir los procesos celulares dinámicos que ocurren a la muerte de la célula.

Este paso se realizó depositando el cerebro en paraformaldehído al 4% alrededor de 15 días.

Después de este tiempo se lavan los cerebros en agua caliente (aprox. 50° C) durante una hora.

## DESHIDRATACIÓN

Después de que la muestra ha sido fijada, se elimina el fijador y se deshidrata.

Debido a que una gran parte del tejido está constituida por agua, se aplica una serie gradual de soluciones acuosas, de menor a mayor grado de agente deshidratante. En este caso la secuencia fue la siguiente:

- Alcohol 70%
  - Alcohol 80%
  - Alcohol 96%
  - Alcohol 96%
  - Alcohol absoluto.
  - Alcohol absoluto.
- Durante 1 hr. en para cada uno.

El procedimiento se hizo gradualmente, ya que si se colocara el tejido en una solución al 100% de alcohol inmediatamente, el agua saldría muy rápido del tejido y se deformaría.

## ACLARAMIENTO

Luego de deshidratar el tejido, se pasó a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión (parafina). La sustancia que utilizamos fue xilol. Esta etapa se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en el xilol, debido a que cambia su índice de refracción.

- Xilol
- Xilol

Durante 1 hr. en cada uno.

## INCLUSIÓN

A fin de que se puedan obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio, los tejidos tienen que ser incluidos y envueltos por una sustancia de consistencia firme. Con este propósito se utilizó la parafina.

La inclusión se logra al infiltrar la parafina líquida, que disuelve el medio de aclaramiento y penetra en el tejido.

Se colocaron los cerebros en un recipiente y se les agregó la parafina fundida a 60° C, hasta cubrirlo completamente. De esta manera se forma el bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido.

## CORTE

El bloque ahora se puede cortar con un microtomo en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz.

Días después de haber colocado en parafina los cerebros, se realizaron cortes de 5-10 µm para cada cerebro en el micrótopo rotatorio (820 HistoSTAT).

Estos cortes se colocan en agua con grenetina a aprox. 40°C, esto con la finalidad de que el corte se extienda y se puedan observar estructuras celulares no sobrepuestas.

Finalmente, los cortes fueron colocados en portaobjetos para su posterior uso en las pruebas inmunológicas e histológicas.

## DESPARAFINADO Y REHIDRATACIÓN

La desparafinación nos servirá para poder teñir el tejido, y ésta se realizó introduciendo los cortes en una serie de compuestos orgánicos:

1. Xilol por 30 min.
2. Xilol por 10 min.

3. Xilol/alcohol (10 ó 96%) por 3 min. 1:1.
4. Alcohol al 100% por 3 min.
5. Alcohol al 100% por 3 min.
6. Alcohol al 96% por 3 min.
7. Alcohol al 96% por 3 min.

### **6.3 Tinción con hematoxilina-eosina**

Los cortes se tiñen sumergiéndose en las siguientes soluciones:

1. en hematoxilina de Harris de 10-15 min.
2. se lava con agua de la llave por 10 min. Dos veces.
3. se lleva a una solución de carbonato de litio saturada hasta que exista un cambio en el color.
4. se lava con agua de la llave por 3 min.
5. se pasa a una solución de eosina de 1-2min.
6. se hace un lavado rápido en alcohol del 70%.
7. se deshidratan en alcoholes graduales.
8. se aclaran con xilol y se montan con resina.

### **6.4 Conteo de células**

Los criterios para evaluar si la célula está dañada son los siguientes:

- Se observan anormalidades en el citoplasma, es decir, podemos ver espacios blancos (como huecos) en el citoplasma.
- Se puede encontrar el núcleo fragmentado.
- Las células se ven picnóticas, es decir muy pigmentadas.
- El núcleo de las células se desplaza hacia las orillas.
- Las células se pueden observar amorfas.

## **6.6 TAZA DE DAÑO NEURONAL**

La tasa de daño neuronal se obtuvo contando la cantidad de células sanas y la de células dañadas, de cada una de las fotos tomadas en cada zona y por cada tratamiento, se hace un promedio por zona de cada conteo y se representa como porcentaje. De esta manera, el % de células muertas con respecto a las totales será la tasa de daño neuronal.

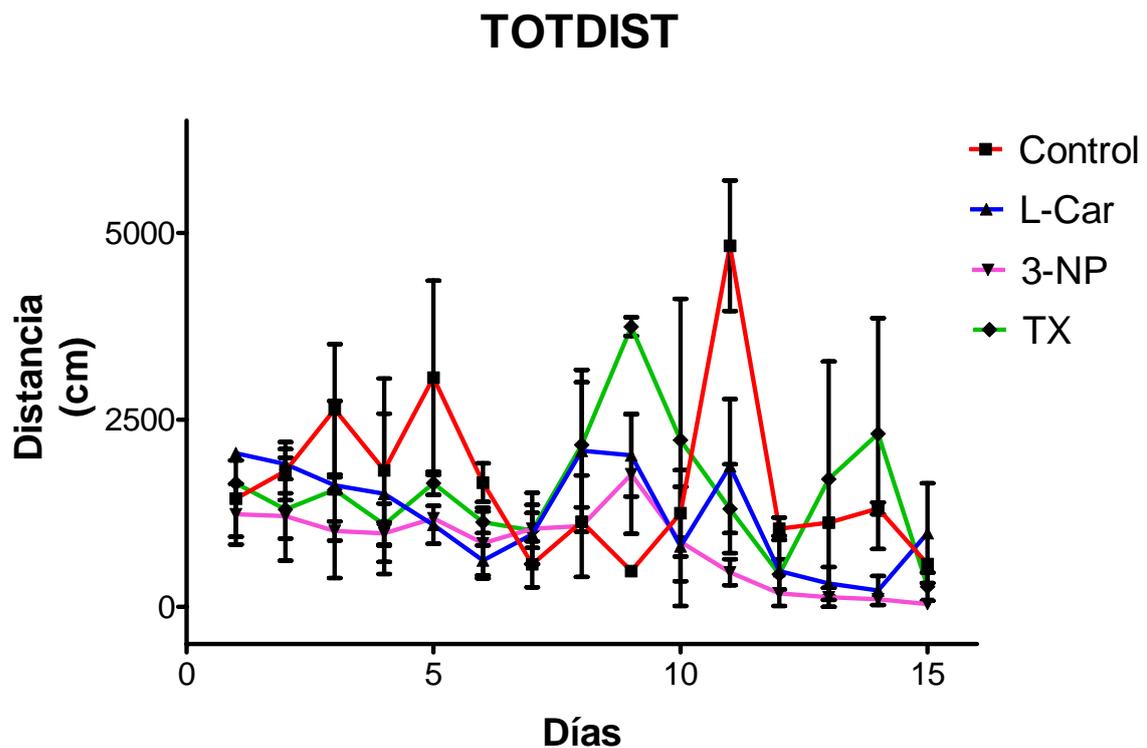
## **6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La prueba estadística realizada tanto para la conducta como para la tasa de daño neuronal, fue un ANOVA de una vía con una prueba posterior de Tukey,  $\alpha=0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Alteraciones motoras y conductuales

La siguiente gráfica representa la distancia total recorrida de cada grupo de animales tratados. Como podemos observar el comportamiento del grupo administrado con 3-NP presenta en la mayoría de los registros una menor actividad que los demás grupos. El control presenta algunos puntos de alta actividad (ej. Día 11) que pueden ser debidos a distractores. El grupo de L-Carnitina y el tratamiento tienen una actividad muy parecida al grupo control.



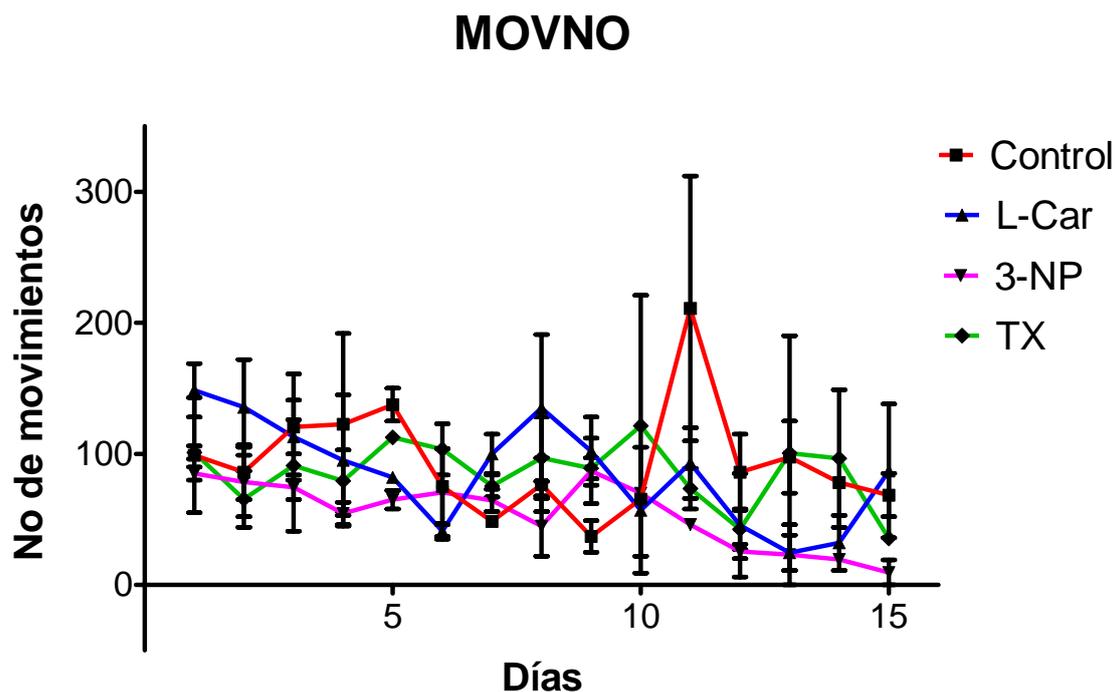
Gráfica 1. TOTDIST (distancia total recorrida en cm.), días contra distancia (cm.). Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía, con una prueba posterior de Tukey.

Los resultados de la prueba nos indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Resultados de la prueba de Tukey:

Columnas comparadas	¿Existen diferencias?
Control vs. L-Car	No
Control vs. 3-NP	Si
Control vs. TX	No
L-Car vs. 3-NP	No
L-Car vs. TX	No
3-NP vs. TX	Si

La siguiente gráfica representa el número de movimientos horizontales que presentan cada uno de los grupos tratados. De igual manera que en el caso anterior se observa claramente que la actividad del grupo tratado con 3-NP es menor que la de los demás grupos y va disminuyendo con el tiempo. El grupo tratado con el tratamiento (TX) y el de la L-Canitina (L-Car), son muy parecidos al grupo control.



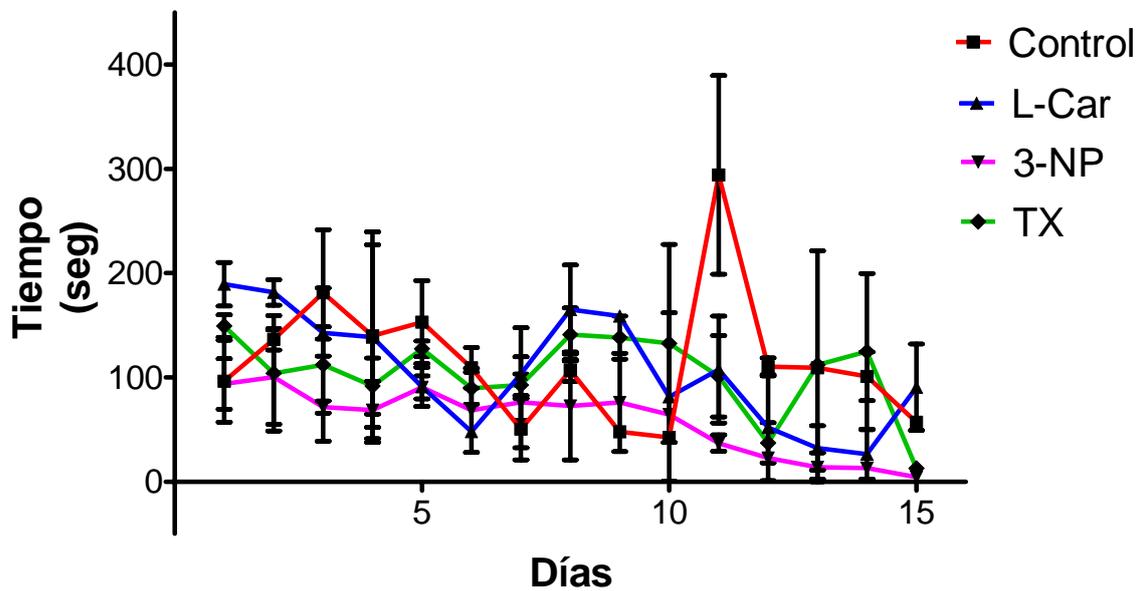
Gráfica de MOVMO (número de movimientos horizontales), días contra No de movimientos. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía, con una prueba posterior de Tukey. Los resultados de la prueba estadística indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Resultados de la prueba de Tukey:

Columnas comparadas	¿Existen diferencias?
Control vs. L-Car	No
Control vs. 3-NP	Si
Control vs. TX	No
L-Car vs. 3-NP	Si
L-Car vs. TX	No
3-NP vs. TX	Si

La siguiente gráfica representa el tiempo en que la rata estuvo deambulando, para cada uno de los grupos tratados. En esta gráfica volvemos a observar que en grupo tratado con el 3-NP muestra una actividad por debajo de los demás grupos y que al final del experimento muestra casi una nula actividad. El tratamiento (TX) y el de la L-Canitina (L-Car), son nuevamente muy parecidos al grupo control, aun que este presenta algunos puntos que salen de un comportamiento normal, como en el día 11, pero que de igual manera se pueden deber a ciertos distractores.

## MOVTIME



Gráfica de MOVTIME (tiempo en seg. que el animal estuvo deambulando), días contra tiempo en seg. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía, con una prueba posterior de Tukey.

Los resultados de la estadística indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

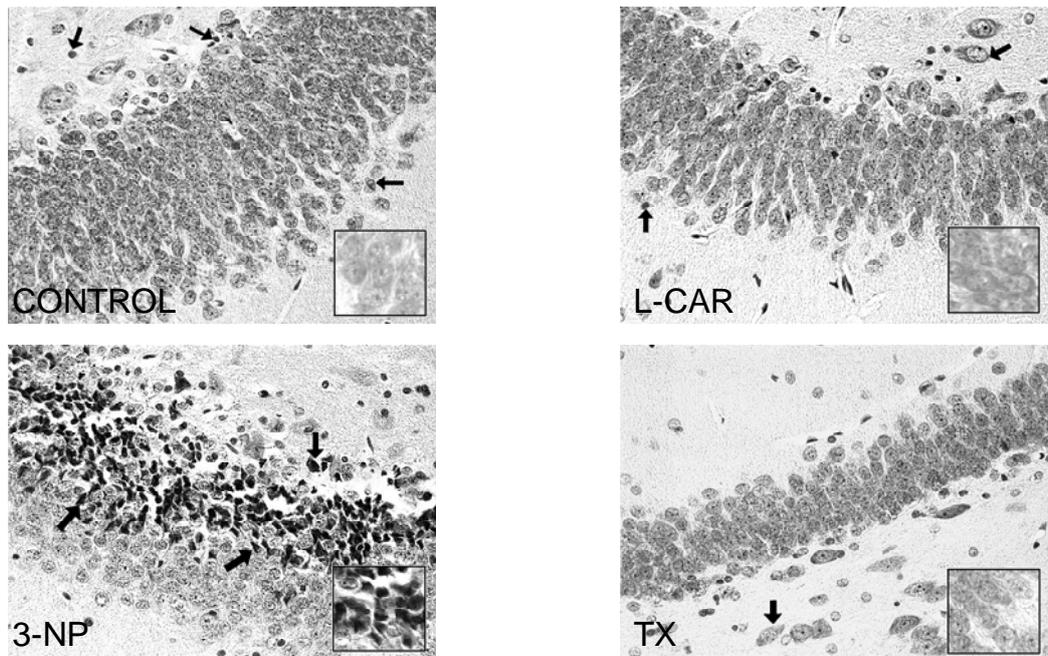
Resultados de la prueba de Tukey:

Columnas comparadas	¿Existen diferencias?
Control vs. L-Car	No
Control vs. 3-NP	Si
Control vs. TX	No
L-Car vs. 3-NP	Si
L-Car vs. TX	No
3-NP vs. TX	Si

## 7.2 Alteraciones morfológicas

En las siguientes imágenes podemos apreciar una región del hipocampo, el giro dentado, para cada uno de los tratamientos. Es evidente que el grupo tratado con 3-NP presenta el mayor daño celular, mientras que los demás grupos se observan muy similares entre sí, sólo con un pequeño daño basal. En el recuadro se encuentra el acercamiento a algunas de las células para su mejor apreciación.

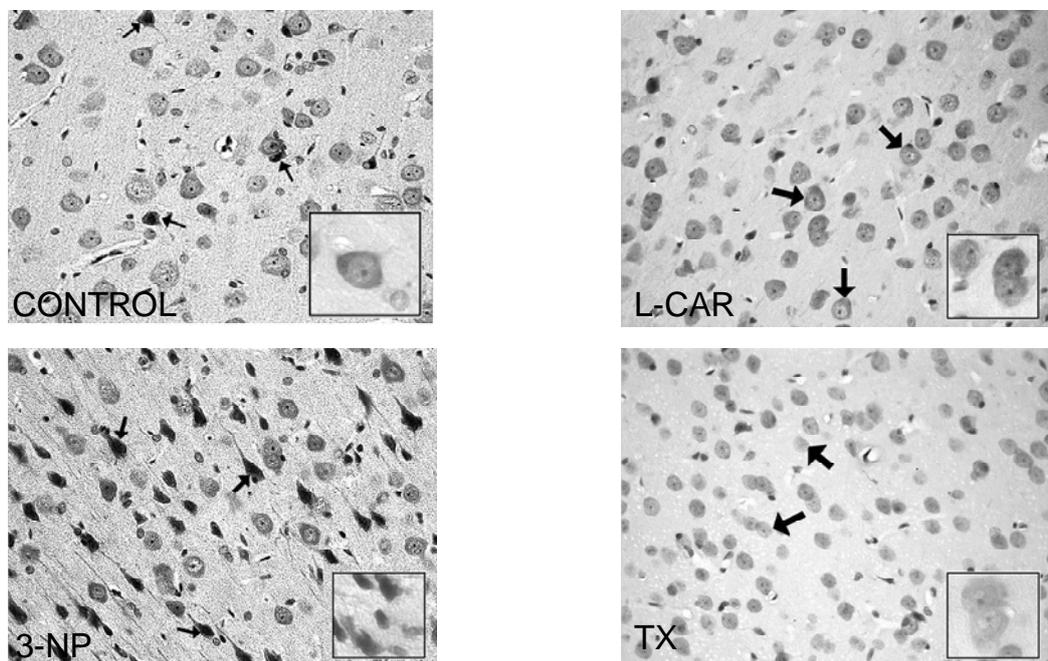
# Hipocampo



**Fig. 1** Fotografías del hipocampo en cada uno de los tratamientos con un aumento de 40X; el recuadro tiene un aumento de 63X. Las flechas indican las células dañadas.

En las siguientes imágenes podemos apreciar la corteza frontal, para cada uno de los tratamientos. Es evidente que el grupo tratado con 3-NP presenta el mayor daño celular, mientras que los demás grupos se observan muy similares entre sí, sólo con un pequeño daño basal. En el recuadro se encuentra el acercamiento a algunas de las células para su mejor apreciación.

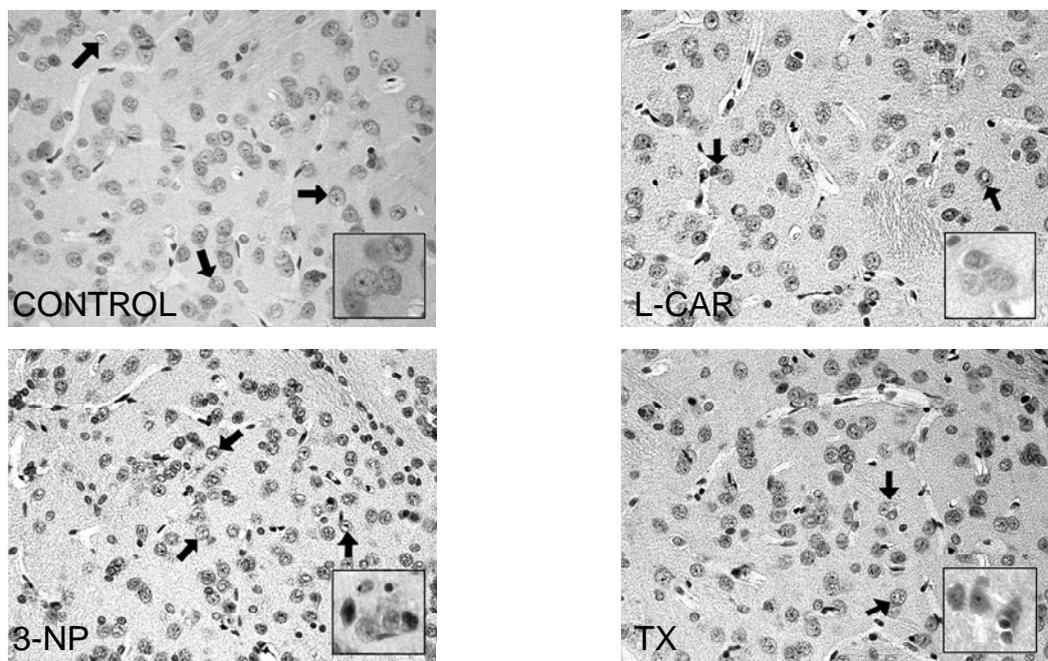
## Corteza frontal



**Fig. 2** Fotografías de la corteza frontal en cada uno de los tratamientos con un aumento de 40X; el recuadro tiene un aumento de 63X. Las flechas indican las células dañadas.

En las siguientes imágenes podemos apreciar el estriado, para cada uno de los tratamientos. Es evidente que el grupo tratado con 3-NP presenta el mayor daño celular, mientras que los demás grupos se observan muy similares entre sí, sólo con un pequeño daño basal. En el recuadro se encuentra el acercamiento a algunas de las células para su mejor apreciación.

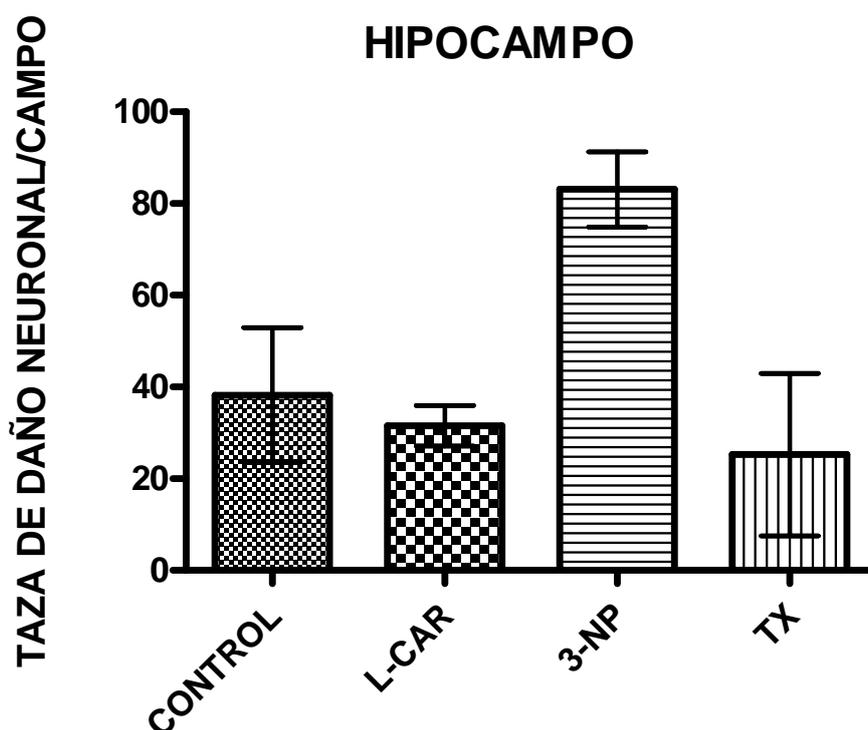
## Estriado



**Fig. 3 Fotografías del estriado en cada uno de los tratamientos con un aumento de 40X; el recuadro tiene un aumento de 63X. Las flechas indican las células dañadas.**

### 7.3 Resultados de la taza de daño neuronal por campo.

La siguiente gráfica muestra la taza de daño neuronal del hipocampo, en donde podemos observar que el índice de daño neuronal para el grupo tratado con 3-NP es mucho más alto que el de los otros grupos. Estadísticamente no existe diferencia entre el control y el 3-NP, esto se puede deber al daño basal del control.



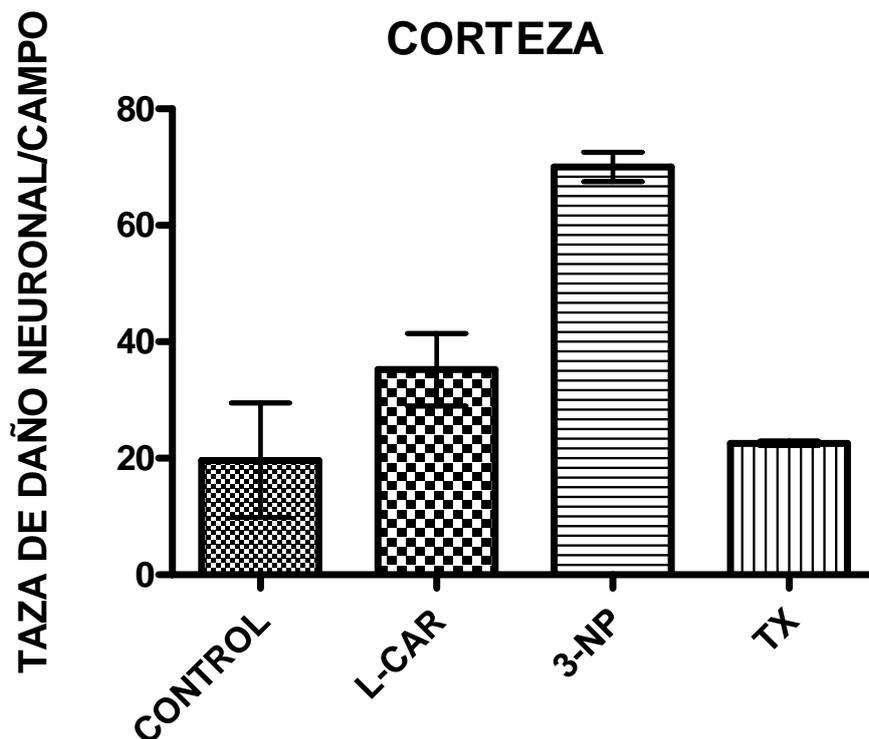
Taza de daño neuronal del hipocampo para cada uno de los tratamientos. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía, con una prueba posterior de Tukey.

Los resultados de la prueba estadística indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Resultados de la prueba de Tukey:

Columnas comparadas	¿Existen diferencias?
Control vs. L-Car	No
Control vs. 3-NP	No
Control vs. TX	No
L-Car vs. 3-NP	Si
L-Car vs. TX	No
3-NP vs. TX	Si

La siguiente gráfica muestra la tasa de daño neuronal del hipocampo, en donde podemos observar que el índice de daño neuronal, para el grupo tratado con 3-NP es mucho más alto el índice que el de los otros grupos. Adicionalmente, con los resultados estadísticos podemos observar que existe esta diferencia, además de que entre los otros grupos, no hay diferencia.



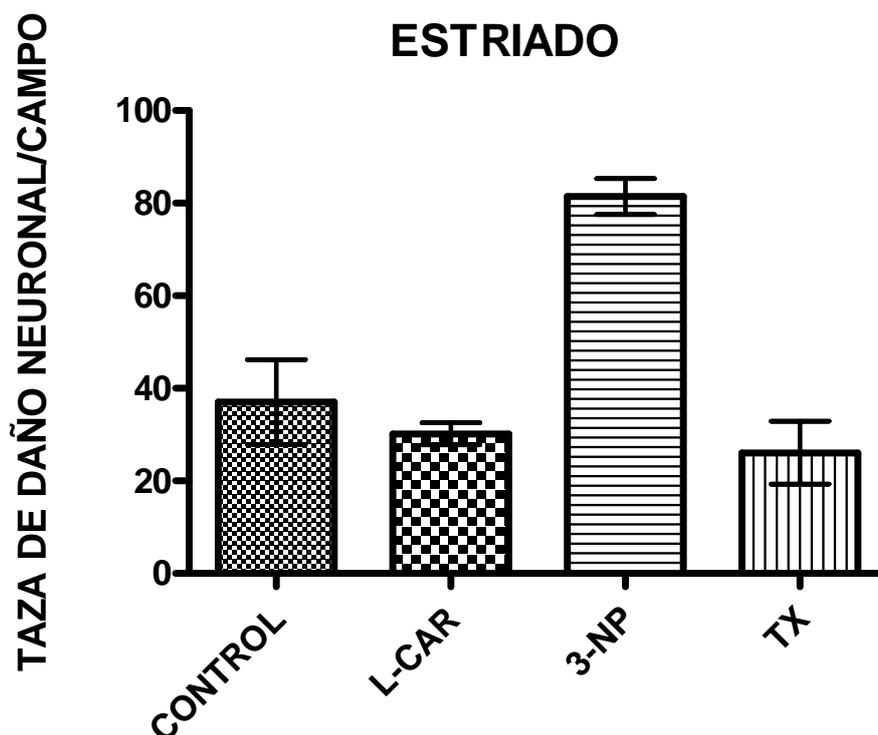
Taza de daño neuronal de la corteza para cada uno de los tratamientos. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía, con una prueba posterior de Tukey.

Los resultados de la prueba estadística indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Resultados de la prueba de Tukey:

Columnas comparadas	¿Existen diferencias?
Control vs. L-Car	No
Control vs. 3-NP	Si
Control vs. TX	No
L-Car vs. 3-NP	Si
L-Car vs. TX	No
3-NP vs. TX	Si

La siguiente gráfica siguiente nos muestra el índice de daño neuronal para el estriado, en donde nuevamente podemos observar que el grupo tratado con 3-NP es el que presenta el mayor índice de daño neuronal, comprobado por la prueba estadística. El grupo del tratamiento y el de L-Carnitina, no muestran diferencias estadísticas.



Taza de daño neuronal del estriado para cada uno de los tratamientos. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía, con una prueba posterior de Tukey.

Los resultados de la prueba estadística indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Resultados de la prueba de Tukey:

Columnas comparadas	¿Existen diferencias?
Control vs. L-Car	No
Control vs. 3-NP	Si
Control vs. TX	No
L-Car vs. 3-NP	Si
L-Car vs. TX	No
3-NP vs. TX	Si

## 8. DISCUSIÓN

Con respecto a la conducta de los animales tratados con L-car y 3-NP, se obtuvieron varios parámetros, pero los cambios más evidentes se presentaron en lo que se refiere al número de movimientos horizontales (MOVNO), la distancia total recorrida (TOTDIST) y el tiempo en que el animal se encontró deambulando (MOVTIME).

Los resultados de todos estos parámetros conductuales nos hablan de la actividad de los animales, y nos dice que no existen diferencias estadísticamente significativas (prueba de Tukey) entre los grupos CTL, L-Car y TX, pero si las hay entre estos grupos con el 3-NP, evocando reportes previos (Vis, 1999). Por la gráfica correspondiente, se puede ver con claridad que para cada uno de los parámetros estudiados, la actividad de las ratas administradas con 3-NP va disminuyendo con el paso de los días, y esta disminución se puede denominar como una hipocinecia, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Borlongan, 1998). Un hecho que es importante hacer notar es que este comportamiento únicamente hipocinético, no concuerda con los resultados obtenidos por Herrera-Mundo, 2006; en donde primero se presenta una fase hipercinética y después una parte hipocinética en las ratas administradas por 3-NP. Estas diferencias son debidas a que esta evaluación se llevó acabo bajo una exposición aguda de la toxina y el modelo que aquí se manejó fue crónico. Grote, 2005; demostró que el daño en el hipocampo puede verse reflejado como una depresión en la conducta de ratones; como podemos observar en las fotografías, y en la taza de daño neuronal, el daño que sufrió el hipocampo es muy evidente, y de esta manera podemos relacionar el daño presentado en esta zona con la hipoactividad de las ratas y con su depresión, que se refleja en la disminución de la actividad. Francis, 1999; obtuvo resultados muy interesantes, en donde los daños que provocaron en el estriado se observaron como un deterioro en el aprendizaje espacial y la recuperación de la memoria. Si nos apoyamos en estos resultados, otra de las posibles causas de la hipoactividad de las ratas administradas con 3-NP puede deberse al deterioro en el estriado, que claramente se puede observar en las fotografías y en la taza de daño neuronal. Este daño a nivel de conducta lo podemos relacionar con la hipocinecia que presentan las ratas en cualquiera de las evaluaciones conductuales, ya que una pérdida en el aprendizaje espacial se manifestara como una disminución en la cantidad de movimientos horizontales, en la distancia total recorrida y

en los movimientos ambulatorios, ya que el animal presuntamente pierde la capacidad para explorar otros espacios. Algo que no debemos perder de vista es el hecho de que la L-Car, disminuyó de manera significativa el efecto hipocinético del 3-NP, en todos los parámetros de conducta evaluados, ya que la L-Car tiene un efecto antioxidante (Tastekin, 2005) que pudo haber contra restado el efecto oxidante del 3-NP, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Tadros, 2005, en donde se probaron varios antioxidantes que disminuyeron el efecto hipocinético del 3-NP.

Las características que se presentan cuando el estriado es dañado por 3-NP, son muy similares a las presentadas cuando la corteza frontal se daña (Francis, 1999), así que en este caso no podemos saber cual de las zonas estudiadas fue la causante de la hipoactividad, ya que cada una de ellas produce efectos similares. Adicionalmente, al ser la administración de tipo sistémica, no se puede asegurar cual de las zonas afectas en el cerebro es la que refleja las alteraciones en el comportamiento.

Como podemos observar en las figuras, el daño provocado por el 3-NP es evidente en cada una de las regiones del cerebro, lo cual ya había sido demostrado por otros autores (Tajrena, 1998). Pero lo más interesante es la forma en que el tratamiento con L-Car disminuye notablemente al daño celular debido a que disminuye el nivel de oxidación en las células, que confirma los resultados vistos por Onem, 2006; donde la L-Car disminuyó los niveles de SOD y de malonaldehído, y también con los de Manrique, 2006; en donde se observó una disminución en la actividad de la catalasa. Sin embargo, se puede ver que el grupo control también presenta cierto daño celular a nivel basal, pero aun así, la tasa de daño neuronal al que llega el grupo que contiene el tratamiento con la L-Car (TX), es menor que la del control en cada una de las regiones del cerebro estudiadas, lo que nos habla de la efectividad de la L-Car. Incluso sobre procesos “normales” de degeneración.

La tasa de daño neuronal evidencia las diferencias de las que ya habíamos hablado antes, entre el 3-NP y los otros grupos, siendo esta diferencia de más del 50%.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen importantes implicaciones en la comprensión de la enfermedad de Huntington. Sabemos que los enfermos con este padecimiento presentan una variedad de problemas psiquiátricos, que incluyen depresión, y trastornos cognoscitivos (Francis, 1999), los cuales se han relacionado y argumentado con los resultados conductuales en este estudio. En la enfermedad de Huntington, la región del cerebro más afectada morfológicamente es el estriado, pero también se observan anormalidades en la corteza (La Fontaine, 1999), y estos aspectos

morfológicos fueron reproducidos claramente y relacionados con la actividad conductual evaluada.

Adicionalmente, las implicaciones de la neuroprotección ejercida por la L-Carnitina enfatizan su potencial como agente terapéutico contra esta y otras enfermedades neurodegenerativas. Estudios mas detallados deben realizarse con este agente, y en el mismo modelo, para apoyar las observaciones de este trabajo.

## **9. CONCLUSIONES**

- La administración sistémica del 3-NP en forma crónica produce hipoactividad en los animales evaluados.
- Las lesiones causadas por el 3-NP a nivel celular, en el cerebro de los animales, son características de la enfermedad de Huntington.
- La conducta de los animales evaluados, tienen una estrecha relación con el daño morfológico producido por el 3-NP.
- La L-Carnitina es un antioxidante que disminuye la hipoactividad provocada por el 3-NP.
- La L-Carnitina disminuye el daño neuronal provocado por el 3-NP en las zonas estudiadas del cerebro.
- El daño en las diferentes regiones cerebrales puede ser un factor que altere el comportamiento de los animales dañados.

## **10. RECOMENDACIONES:**

- Probar la protección con diferentes antioxidantes o combinaciones de estos contra el daño causado por la toxina.
- Medir la actividad conductual durante más días, es decir un tiempo mayor a un mes.
- Probar con el mismo antioxidante, pero con un modelo diferente de la enfermedad de Huntington.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Borlongan CV, Koutouzis TK, Poulos S G, et al. Bilateral fetal striatal grafts in the 3-nitropropionic acid-induced hypoactive model of Huntington's disease. *Cell Transplant*. 1998, pág. 131-5.
- Brass P. Eric, Supplemental carnitine and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007 pág. 618S-619S.
- Brownell AL, Chen YI, Yu M, et al. 3-Nitropropionic acid-induced neurotoxicity-- assessed by ultra high resolution positron emission tomography with comparison to magnetic resonance spectroscopy. *Journal Neurochemistry*. 2004,1206-14
- Francis L., Cruz R., Antúnez I., et al. Caracterización conductual de un modelo de la enfermedad de Huntington en ratas inducido por ácido quinolínico. *Revista de neurología*, 1999. pág.1018-1020.
- Gatto Emilia, Enfermedad de Huntington: tratamiento, *Revista de Neuro-psiquiatria*, 2002, pág. 206-209.
- Gould DH, Gustine DL. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid. *Neuropathology Applied Neurobiology*. 1982. pág. 377-93.
- Grote HE, Bull ND, Howard ML, et al. Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine. *European Journal Neuroscience*. 2005. pág. 2081-8.
- Herrera M. Ma. Nieves, Silva A. Daniela, Maldonado D. Perla, et al. Effects of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced hiperactivity, early changes in superoxide dismutase activity and mitochondrial dysfunction in the rat striatum. *Neuroscience Research*, 2006.

- Koutouzis TK, Borlongan CV, Scorcia T, et al. Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects on locomotor behavior. *Brain Research*, 1994. pág.242-6.
- Kumar P, Padi SS, Naidu PS, Kumar A, et al. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behavior Pharmacology*, 2006. pág. 485-92.
- La Fontaine Michael A., Geddes James W., Banks Andrea, et al. 3-nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in strial and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Research*, 2000. pág. 356, 359-360.
- Lastres-Becker I, Fezza F, Cebeira M, et al. Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport*, 2001. pág. 2125-9.
- Manrique HM, Miquel M, Aragon CM, et al. Acute administration of 3-nitropropionic acid, a reactive oxygen species generator, boosts ethanol-induced locomotor stimulation. New support for the role of brain catalase in the behavioural effects of ethanol. *Neuropharmacology*, 2006. pág.1137-45.
- Nam E, Lee SM, Koh SE, et al. Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Research*, 2005. pág. 90-6.
- Newcomb JD, Brown WD, Rodriguez AI, et al. Behavioral alterations in Lewis rats following two-day continuous 3-nitropropionic acid administration. *Neurotoxicology Research*, 2005. pág.259-66.
- National Institutes of Health, Bethesda, Office of Communications and Public Liaison, National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2007. [http://www.ninds.nih.gov/disorders/huntington/detail\\_huntington.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/huntington/detail_huntington.htm)

- Onem G, Aral E, Enli Y, et al. Neuroprotective effects of L-carnitine and vitamin E alone or in combination against ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal Surgery Research*. 2006. pág.124-30.
- PDRhealth,  
[http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/lca\\_0060.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/lca_0060.shtml), 2007.
- Penney JB Jr, Young AB. Quantitative autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington disease. *Neurology*, 1982. pág.1391-5.
- Rossi S, Prosperetti C, Picconi B, et al. Deficits of glutamate transmission in the striatum of toxic and genetic models of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 2006 Dec 13;410(1):6-10. Epub 2006 Oct 27.
- Silva RH, Abilio VC, Kameda SR, et al. Effects of 3-nitropropionic acid administration on memory and hippocampal lipid peroxidation in sleep-deprived mice. *Program Neuropsychopharmacology Biology Psychiatry*. 2007 pág. 65-70.
- Rodriguez-Martinez E, Rugerio-Vargas C, Rodriguez AI, et al. Antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on oxidative damage in hippocampus caused by the administration of 3-nitropropionic acid in rats. *Int Journal Neuroscience*. 2004 pág. 1133-45.
- Tadros MG, Khalifa AE, Abdel-Naim AB, et al. Neuroprotective effect of taurine in 3-nitropropionic acid-induced experimental animal model of Huntington's disease phenotype. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 2005 pág. 574-82.
- Tajrena Alexi, Hughes Paul, Faull Richard, et al. 3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration, *NeuroReport*, 1998. pág. R57-R61, R63.
- Tastekin A, Gepdiremen A, Ors R, et al. L-carnitine protects against glutamate- and kainic acid-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rats.

Brain Development, 2005. pág. 570-3.

- Vis JC, Verbeek MM, De Waal RM, Ten Donkelaar HJ, et al. 3-Nitropropionic acid induces a spectrum of Huntington's disease-like neuropathology in rat striatum. *Neuropathology Applied Neurobiology*, 1999 pág. 513-21.
- Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. Reversible mouse model of Huntington's disease. 1999 Huntington's Disease Research Conference. Cambridge, MA USA: August 13-15.
- Zbigniew Binienda, Ashraf Virmani, Beata Przybyla-Zawislak, et al. Neuroprotective effect of L-Carnitine in the 3-nitropropionic acid (3-NPA)-evoked neurotoxicity in rats. *Neuroscience letters*, 2004. pág. 264, 266.
- Zbigniew K. Binienda, Syed F. Ali, Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicology letter*, 2001. pág. 67-68.