



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

RESCATE DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN SINAPTOSOMAS  
EN DOS MODELOS *IN VIVO* DE LA ENFERMEDAD  
DE HUNTINGTON: QUIN Y 3-NP

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

YOLANDA ROBLEDO ARRATIA



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

2010



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos de la Alumna  
Robledo  
Arratia  
Yolanda  
53 17 30 93  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303084983
2. Datos del Tutor  
Dr.  
Abel  
Santamaría  
Del Ángel
3. Datos del Sinodal 1  
Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez
4. Datos del Sinodal 2  
Dra.  
Yolanda Irasema  
Chirino  
López
5. Datos del Sinodal 3  
Dra.  
María Elena  
Chánez  
Cárdenas
6. Datos del Sinodal 4  
M. en C.  
María de los Ángeles  
Aguilar  
Santamaría
7. Datos del Trabajo Escrito  
Rescate de la función mitocondrial y la actividad antioxidante en sinaptosomas en dos modelos *in vivo* de la enfermedad de Huntington: QUIN y 3-NP.  
85 p  
2010

## DEDICATORIAS

A mis papás. Por el apoyo absoluto que hoy me permite consolidarme como Bióloga, por haberme educado en libertad y dar lo mejor de sí para que yo sea feliz. Porque todo lo bueno que hay en mí se los debo a ellos. Sobre todo, por su amor incondicional.

A mamá, por ser ella quien soporta mi carácter cambiante y explosivo día con día. Por sus cuidados constantes y su entrega total hacia nosotros. Por darme las herramientas primordiales para triunfar académicamente. Por ser mi sostén emocional y porque su formación y cariño me impulsan a ser una mejor persona.

A papá, por estar ahí siempre que lo necesito; por enseñarme a ser culta, crítica, a tomar decisiones firmes que me han permitido avanzar en muchos aspectos de mi vida. Por todos los consejos y el apoyo en momentos difíciles. Porque la manera en que nos educó nos ha hecho especiales, nos hace salir de lo cotidiano.

A Luis y Diego, Diego y Luis: mis hermanos. Por TODA la ayuda, física y emocional; por ser los brazos, las piernas y, muchas veces, la cabeza que me sostiene. Por los cuidados, las pláticas, las confidencias; por compartir conmigo puntos de vista y opiniones que nadie más tiene. Por aceptar todas mis rarezas. Porque a pesar de nuestras constantes peleas abundan las risas. ¡Los quiero muchísimo!

A todos mis amigos:

Sobre todo a Mónica, Zitlali, Leslie, Gaby, Melisa, Pamela y Ricardo, por su cariño y confianza, por compartir momentos importantes a mi lado: tristezas, alegrías, enojos, locuras. Por “estar ahí” SIEMPRE.

A Yanus, Nahum, Germán y Elizabeth, por ser personas excepcionales con las que comparto muchas ideas y formas de ver la vida. Por los momentos de debraye, por las risas, la convivencia sana y destructiva, ¡son la neta!

A todos aquellos a quienes no veo tanto pero que siempre me hacen sonreír: Sergio, Poncho, Gonzo, Marce, Pau, Jandro, Mitzy, Rubén y en especial, a Rafa.

A mis niñas de la prepa: Linda, Nallely, Eva, Yec, Andrea, Diana y Bere.

A todos los que se me pudieran haber pasado pero que saben, forman parte de mí.

A todos los excelentes profesores con los que tomé clase, que más allá de transmitirme conocimientos, me contagiaron de su amor y sorpresa por la Biología. A los profesores nefastos, por incitarme a ser mejor cada día para nunca parecerme a ellos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de sus filas y por darme una formación científica, social y humanística que me ha permitido crecer y que no hubiera logrado en ningún otro sitio. ¡Me siento muy feliz de pertenecer a ella!

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, por prestarme el espacio físico donde pude desarrollar el trabajo que derivó en esta tesis.

Al Dr. Abel Santamaría por darme la oportunidad de estar su equipo, por guiarme y apoyarme en la realización de este trabajo y por darme una proyección profesional importante al impulsar las publicaciones que de mi estancia en su laboratorio resultaron.

A la Dra. Verónica Pérez-De La Cruz, por sus enseñanzas y asesorías, por toda su disposición para ayudarme, aún estando en Baltimore. ¡Muchas gracias! Al Dr. Paul Carrillo, por aclararme siempre todas mis dudas, ser un gran compañero y por ayudarme con el manejo de animales. A la M. en C. Daniela Silva, por sus asesorías técnicas. A la Sra. Tere, por hacerme compañía sábados y días festivos y por ayudarme con las ratas cuando me ponía nerviosa. A todos ustedes, ¡gracias por su amistad!

Al resto de los integrantes del laboratorio de “Aminoácidos Excitadores” (Bere, Rafa, Diana y Luis), por la ayuda técnica que me pudieran haber brindado y los momentos agradables que pasé en él.

A Diego (mi hermano), por sacrificar su tiempo libre y acompañarme al laboratorio sábados, domingos, días festivos y permanecer en él varias ocasiones hasta casi la media noche.

A los revisores de esta tesis:

Dra. María Elena Chánez Cárdenas

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Dra. Yolanda Irasema Chirino López

M. en C. María de los Ángeles Aguilar Santamaría

Por sus oportunas correcciones y acertados comentarios que me permitieron mejorar este escrito.

*Soy demasiado curioso, demasiado  
problemático, demasiado pedante para  
contentarme con una respuesta burda.*

*Friedrich Nietzsche*

*Descansamos; una pesadilla tiene el poder de envenenar nuestro sueño.  
Despertamos; un pensamiento errante nos estropea el día.  
Sentimos, concebimos o razonamos; reímos o lloramos.  
Abrazamos una querida angustia o añoramos nuestra zozobra;  
es indiferente: pues sea pena o alegría,  
el camino del olvido permanece siempre abierto.  
El hombre de ayer jamás puede ser igual al de mañana;  
nada es duradero sino la propia mutabilidad,  
el continuo cambio de la vida.*

*Mary Shelley*

## ÍNDICE

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	3
3. Introducción.....	5
3.1 Generalidades del Sistema Nervioso.....	5
3.1.1 Receptores.....	9
3.1.1.1 Receptores Glutamatérgicos.....	10
3.1.1.1.1 Receptores <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato.....	11
3.2 Estrés Oxidante y Nitrosativo.....	11
3.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno.....	14
3.2.2 Vulnerabilidad del Sistema Nerviosos Central.....	17
3.2.3 Daño Neuronal.....	17
3.2.3.1 Peroxidación Lipídica.....	18
3.2.3.2 Caída de la Actividad Mitocondrial.....	19
3.3 Enfermedad de Huntington.....	20
3.3.1 Modelos de la Enfermedad de Huntington.....	21
3.3.1.1 Modelos Fenotípicos.....	23
3.3.1.1.1 Modelo del Ácido Quinolínico.....	23
3.3.1.1.1.1 Hipótesis Kinurinérgica.....	27
3.3.1.1.1.2 Excitotoxicidad.....	29
3.3.1.1.2 Modelo del Ácido 3-Nitropropiónico.....	31
3.3.1.1.1.2.1 Déficit Energético.....	34
3.4 Compuestos con Actividad Antioxidante y Proenergética.....	34
3.4.1 L-carnitina.....	35
3.4.1 S-alilcisteína.....	36
4. Antecedentes.....	38
5. Justificación.....	42
6. Hipótesis.....	43
7. Objetivos.....	44
7.1 Objetivo general.....	44
7.2 Objetivos particulares.....	44
8. Materiales y métodos.....	45
8.1 Animales y Materiales.....	45
8.2 Esquema de administración de las drogas.....	46
8.3 Medición de la Conducta.....	47
8.4 Pruebas bioquímicas.....	47
8.4.1 Obtención de sinaptosomas.....	47
8.4.2 Funcionalidad mitocondrial.....	48
8.4.3 Peroxidación de lípidos.....	48
8.4.5 Medición de proteínas.....	49

8.5 Análisis estadístico .....	49
9. Resultados.....	50
9.1 Conducta de rotación .....	50
9.2 Disminución del daño a los lípidos de membrana.....	52
9.3 Rescate de la actividad mitocondrial .....	55
10. Discusión .....	58
11. Impacto social.....	69
12. Conclusiones .....	71
13 Perspectivas.....	72
14. Glosario.....	73
15. Publicaciones.....	76
16. Referencias.....	77



## 1. ABREVIATURAS

★ 3-HK	3-hidroxikinurenina
★ 3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
★ 3-NT	3-Nitrotirosina
★ 8-OHdG	8-hidroxi-desoxiguanosina
★ ACh	Acetilcolina
★ Acetil-CoA	Acetil coenzima A
★ AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
★ APDC	2R,4R-4-aminopirrolidina-2-4-dicarboxilato
★ APM	Apomorfina
★ CAT	Catalasa
★ CuZnSOD	Cobre/zinc-superóxido dismutasa
★ DHPG	Dihidroxifenilglicina
★ DPS	Densidad postsináptica
★ EAE	Extracto de ajo envejecido
★ EH	Enfermedad de Huntington
★ EN	Estrés nitrosativo
★ EO	Estrés oxidante
★ ER	Especies reactivas
★ ERB	Especies reactivas de bromuro
★ ERC	Especies reactivas de cloro
★ ERN	Especies reactivas de nitrógeno
★ ERO	Especies reactivas de oxígeno
★ ERS	Especies reactivas de azufre
★ FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleótido reducido
★ GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
★ Glu	Glutamato
★ Gly	Glicina
★ GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
★ GSH	Glutación reducido
★ GPx	Glutación peroxidasa
★ GST	Glutación S-transferasa
★ IL	Interleucina
★ iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
★ <i>i.p.</i>	Intraperitoneal
★ KA	Kainato
★ KYN	Kinureninas
★ KYNA	Ácido kinurénico
★ L-AP4	L-amino-4-fosfonobutirato
★ L-CAR	L-carnitina

★ MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
★ MCP-1	Monocito quimioatrayente proteína-1
★ MDA	Malondialdehído
★ MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
★ NADH	Nicotinamín adenina dinucleótido reducido
★ NADP <sup>+</sup>	Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato
★ NADPH	Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato reducido
★ NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
★ NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
★ PA	Potencial de acción
★ PL	Peroxidación lipídica
★ PNR	Producto no radical
★ QCA	Ácido quinoxalindicarboxílico
★ QUIN	Ácido quinolínico
★ rNMDA	Receptores NMDA
★ RTK	Receptor de tirosín cinasa
★ SAC	<i>S</i> -alilcisteína
★ SDH	Succinato deshidrogenasa
★ SNC	Sistema nervioso central
★ SNP	Sistema nervioso periférico
★ SERT	Transportador específico de serotonina
★ SOD	Superóxido dismutasa
★ TBA	Ácido tiobarbitúrico
★ TBARS	Sustancias reactivas al TBA

## 2. RESUMEN

El estrés oxidante (EO) juega un papel determinante en muchas enfermedades y en procesos asociados con el envejecimiento. En años recientes se ha visto que este fenómeno, sumado a alteraciones en el metabolismo energético, tiene preponderancia en los desórdenes neurodegenerativos y por ello se ha convertido en uno de los puntos a combatir en la búsqueda de tratamientos preventivos o curativos.

Uno de los padecimientos en los que estas fallas se manifiestan es la enfermedad de Huntington (EH), caracterizada por alteraciones motoras (córea, determinada por movimientos involuntarios), psiquiátricas (agresividad y depresión), y daño profundo en las funciones cognitivas. Dos son los modelos fenotípicos más ampliamente utilizados para simular las diferentes etapas de este mal: el de roedores tratados con ácido quinolínico (QUIN), un metabolito endógeno del triptófano con características excitotóxicas y pro-oxidantes, y roedores tratados con ácido 3-nitropropiónico (3-NP), una toxina encontrada en algunas plantas y hongos que causa la interrupción del metabolismo energético. A pesar de la similitud que guardan con la EH, dichos modelos no son específicos de ella, también sirven para representar características comunes a alteraciones en el cerebro como son el EO, la excitotoxicidad y las perturbaciones metabólicas.

La reciente importancia que han adquirido los estudios realizados con antioxidantes y moléculas proenergéticas en investigación básica y aplicada llevó a la planeación del presente trabajo. Ratas Wistar macho fueron administradas intraestriatalmente con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L). A manera de postratamiento recibieron un compuesto que favorece el estatus energético de la célula, L-carnitina (L-CAR, 100 mg/kg *i.p.*); o bien, uno que disminuye las reacciones oxidantes, S-alilcisteína (SAC, 300 mg/kg *i.p.*). Los agentes protectores fueron suministrados en una dosis única (120 minutos después de haber aplicado las toxinas) y el tejido nervioso fue procesado dos horas más tarde para realizar las pruebas bioquímicas. Otros grupos de animales, en cambio, recibió el compuesto de manera consecutiva durante siete días, iniciando el tratamiento 2 horas después de la infusión tóxica intraestriatal y decapitando a los animales para obtener el tejido 3 horas después de la última inyección. Para determinar si L-CAR y SAC podían ejercer acciones de rescate en términos de funcionalidad e integridad celular una vez que el organismo hubiera sido expuesto a un insulto tóxico, se evaluó la peroxidación lipídica y la funcionalidad de la mitocondria en fracciones sinaptosomales aisladas, así como la conducta de rotación en aquellos roedores que recibieron el tratamiento por varios días.

En distinto grado, ambos compuestos resultaron ser efectivos para frenar los daños inducidos por las toxinas y reestablecer la funcionalidad celular. Los ensayos para determinar la peroxidación lipídica y la funcionalidad de la mitocondria en las fracciones sinaptosomales de los animales que recibieron la dosis única de L-CAR así lo comprueban. El daño a los lípidos de membrana en presencia de QUIN se diparó 92% por arriba del control, mientras que ante 3-NP, los niveles incrementaron un 98% comparado con el control. En cambio, el grupo que recibió QUIN+L-CAR disminuyó su grado de lipoperoxidación un 66% con respecto a los animales que sólo recibieron la dosis tóxica de QUIN. El grupo QUIN+3-NP también presentó menos alteraciones en los lípidos de membrana, disminuyendo éstas un 72% con respecto al grupo de 3-NP. La actividad reductora de la mitocondria en los grupos de administración aguda no se vio reestablecida. A los 7 días, la conducta de rotación disminuyó en presencia de L-CAR, pues los grupos que recibieron únicamente QUIN o 3-NP presentaron en promedio 105 y 78 giros, respectivamente. Con el postratamiento los valores cambiaron a 5 para QUIN y 24 para 3-NP. Las medidas de peroxidación fueron parcialmente positivas, ya que ante QUIN el valor aumentó 400% y 3-NP lo hizo 275%, con respecto al control. Aunque la L-CAR no restauró este valor por debajo de las condiciones control, sí logró disminuirlo un 35% en el grupo QUIN+L-CAR, con respecto a QUIN y 33% en el grupo 3-NP+L-CAR, comparado contra el 3-NP.

Tras el postratamiento con SAC ocurrieron circunstancias similares. Sólo se obtuvieron resultados bajo el esquema subcrónico. Los grupos que recibieron QUIN o 3-NP exacerbaron su conducta de rotación; los animales presentaron 102 y 74 giros, respectivamente. Tras la aplicación de SAC, se redujeron a 5 para el grupo del QUIN y 20 para el del 3-NP. SAC también detuvo el daño peroxidante parcialmente; el grupo del QUIN aumentó el nivel de lípidos dañados 150%, mientras que el del 3-NP lo hizo 70%, con respecto al control. Sólo el tratamiento posterior al 3-NP disminuyó la peroxidación (66% comparando contra el grupo que recibió solamente la toxina). Finalmente, la capacidad reductora de la mitocondria decayó 50% ante el QUIN y 20% ante el 3-NP, comparando con el control. En el grupo QUIN+SAC, la funcionalidad rebasó al grupo de QUIN en 400% y, el de 3-NP+SAC, superó al que sólo se trató con la toxina en 100%.

Estos resultados dejan claro que en condiciones *in vivo* L-CAR y SAC pueden rescatar hasta cierto punto la funcionalidad de la mitocondria en términos de su capacidad reductora y reestablecer la actividad antioxidante al impedir la oxidación de los lípidos de membrana. No obstante, los resultados indican que L-CAR actúa de una manera más eficaz ante el daño provocado.

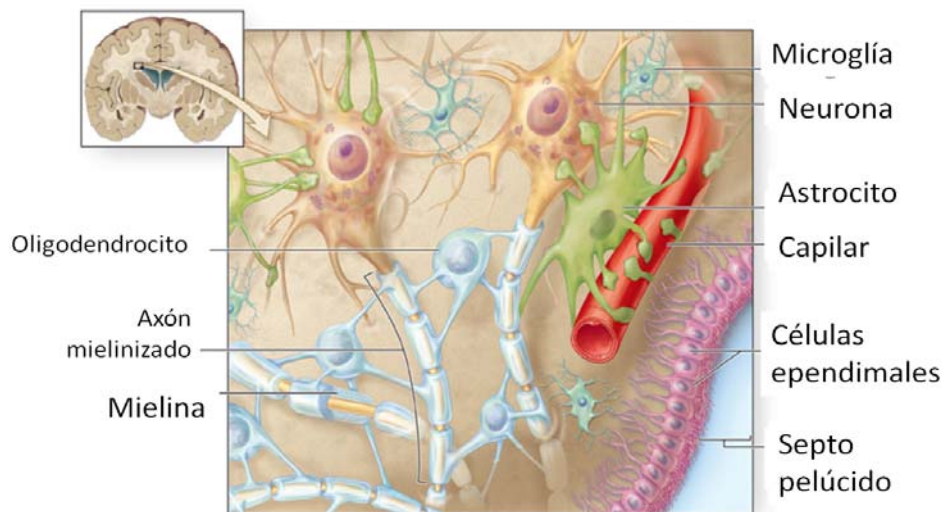
*Ninguna búsqueda puede tener mejor premio,  
un objetivo más admirable, que la emoción de  
revisar a fondo nuestra forma de entender las cosas.  
Stephen Jay Gould*

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO

Desde el siglo XIX se reconoce a la célula como la unidad fundamental de la vida. No obstante, existían dudas y controversias en el caso del sistema nervioso. Fue hasta bien entrado el siglo XX que se concretó la idea de que el tejido nervioso estaba formado por células.

El sistema nervioso está constituido por células nerviosas o neuronas y células de sostén también llamadas glía o neuroglía (fig. 1). Las primeras están especializadas en el señalamiento eléctrico a largas distancias; las segundas, en cambio, no pueden efectuar este tipo de actividad, pero llevan a cabo funciones esenciales en el encéfalo tanto en etapas tempranas como tardías (Purves *et al.* 2007).

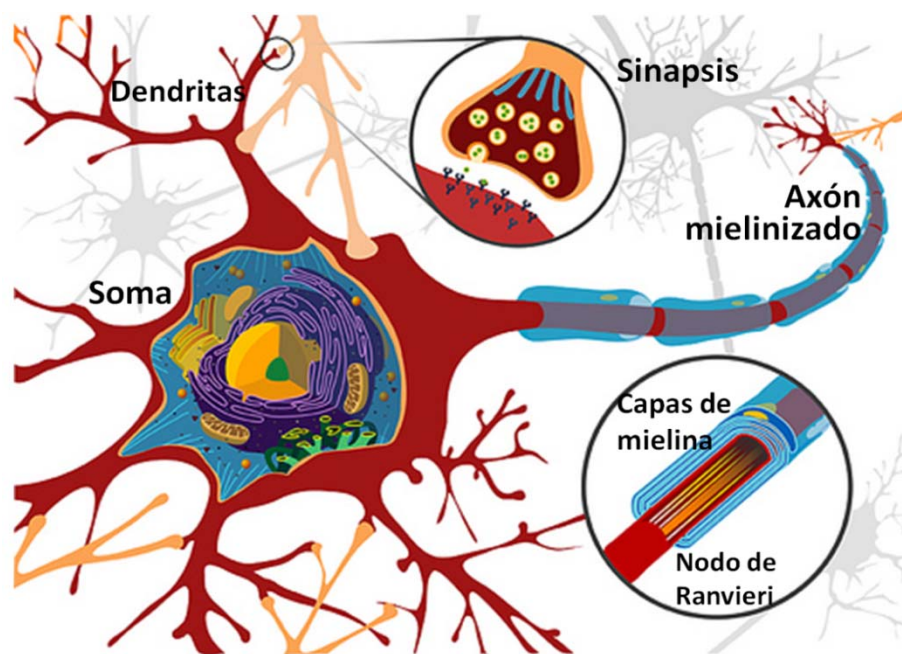


**Figura 1.** Representación de un corte de cerebro. Puede apreciarse la diversidad celular que existe en el tejido nervioso. *Imagen modificada [http://academic.kellogg.edu]*

La organización celular básica de las neuronas se asemeja a la de otras células pero las células nerviosas han evolucionado, desarrollando especializaciones que les permiten recibir, procesar y transmitir información química y eléctrica. Todas las **neuronas** se caracterizan por tener un **soma** o cuerpo celular, el cual es responsable del mantenimiento metabólico de la célula (Randall *et al.* 2002). Del cuerpo neuronal emanan algunas fibras: **las dendritas**

son el signo más evidente de especialización neuronal, son una ramificación extensa del soma (Purves *et al.* 2007), actúan como un receptor que junta señales emitidas desde otras neuronas y las llevan hacia el cuerpo celular (Randall *et al.* 2002). **El axón**, en cambio, es una extensión de la neurona que conduce señales eléctricas fuera del soma (Randall *et al.* 2002). Dicho acontecimiento se denomina *potencial de acción*<sup>1</sup> (PA) y su punto de inicio es el cuerpo celular o botón axónico (Purves *et al.* 2007).

El proceso químico o eléctrico por el cual la información se transmite de neurona a neurona o de neurona a otro órgano blanco, se conoce como **sinapsis** (fig. 2) (Randall *et al.* 2002). Los contactos sinápticos se hacen sobre las dendritas. En condiciones típicas, la terminación presináptica es inmediatamente adyacente a la postsináptica. En la mayoría de las sinapsis no hay continuidad física, los componentes se comunican a través de la secreción de ciertas moléculas que deben atravesar un espacio denominado hendidura sináptica (Purves *et al.* 2007).



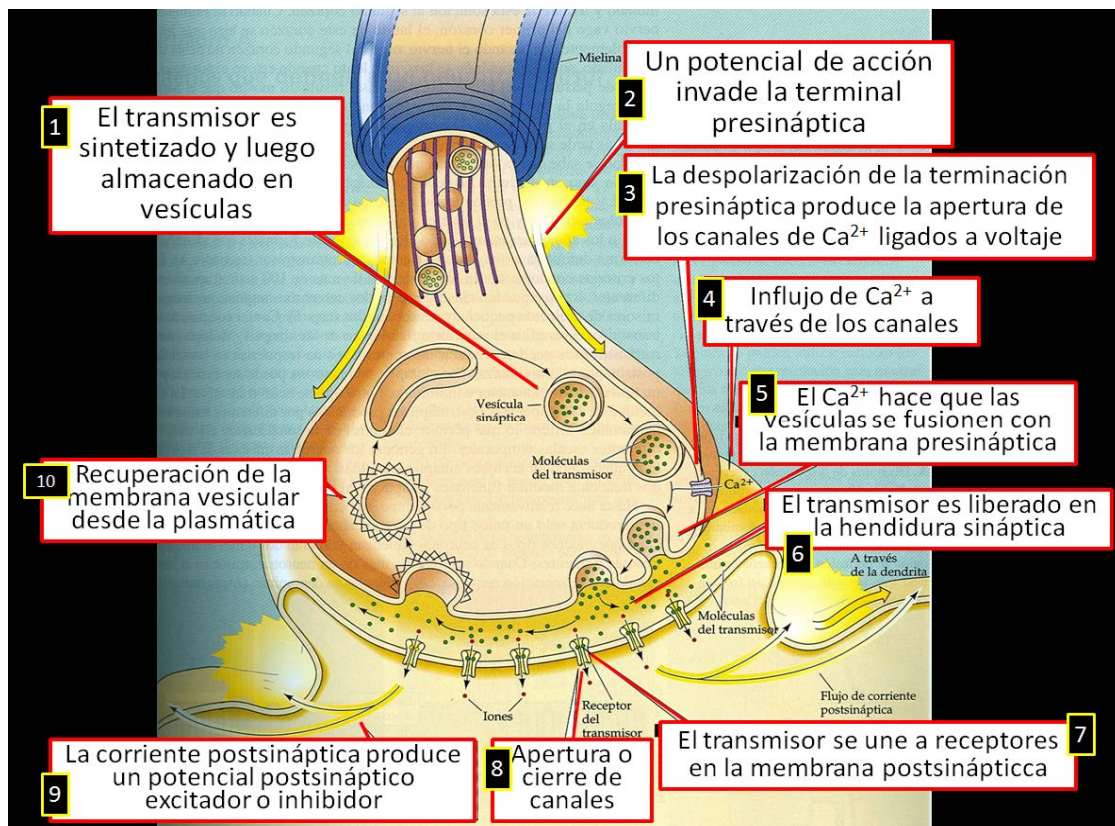
**Figura 2.** Organización básica de las neuronas y representación de la sinapsis. Se aprecian en detalle las neuronas presinápticas y postsinápticas, así como la composición del tracto axonal  
*Imagen modificada [http://upload.wikimedia.org/].*

En las sinapsis eléctricas, las membranas plasmáticas de las neuronas pre y postsinápticas establecen un contacto directo a través de *uniones tipo gap*. De esta manera los iones pueden fluir directamente de una célula a otra favoreciendo la rapidez en el proceso de transmisión, pero se van perdiendo con el tiempo y la

<sup>1</sup> Los conceptos marcados en cursivas son definidos en la sección 15 de este trabajo.



distancia. En las sinapsis químicas, en cambio, lo que ocurre es que una vez que el PA ha bajado por el axón y se ha esparcido por el cono, los neurotransmisores comienzan a almacenarse en pequeñas vesículas formadas de membrana plasmática, que posteriormente serán liberadas en la hendidura sináptica. El neurotransmisor liberado se unirá a receptores específicos de la membrana postsináptica, en los canales sensibles a ligando. La apertura de canales permite que una pequeña corriente iónica fluya a través de dicha membrana. Esta es una forma rápida de que ocurra la transmisión sináptica química (fig. 3). También puede ocurrir de manera más lenta, por medio de neurotransmisores que se unen a canales asociados con segundos mensajeros, que activarán una cascada de información que tardará más en realizarse pero perdurará más (Randall *et al.* 2002).

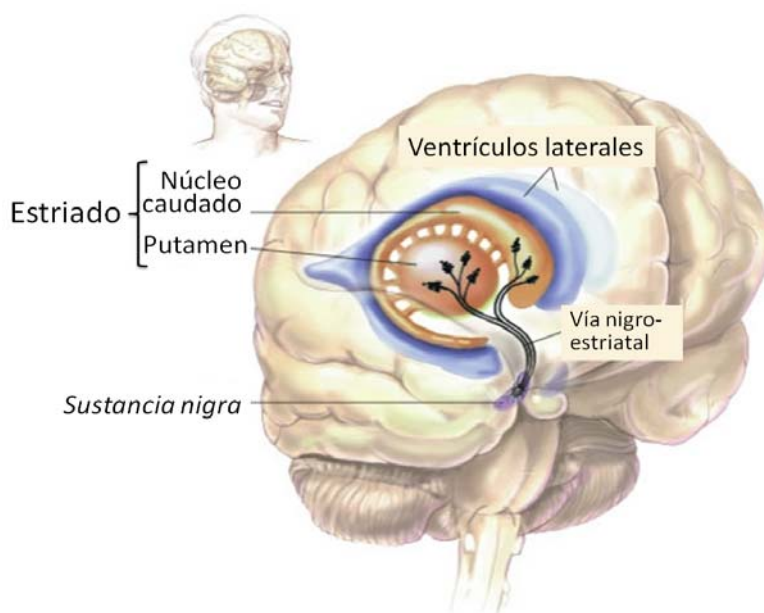


**Figura 3.** Secuencia de pasos de una sinapsis química típica (Purves *et al.* 2007).

Una de las clasificaciones más amplias en que los neurocientíficos dividen al sistema nervioso de los vertebrados desde el punto de vista anatómico son los componentes central y periférico. **El sistema nervioso central (SNC)**, comprende el encéfalo (hemisferios cerebrales, diencefalo, cerebelo y puente) y médula espinal. El **SNP**, en cambio, incluye a las neuronas sensoriales que conectan a los receptores sensitivos sobre la superficie del cuerpo. De manera

profunda en el SNC, destacan ciertas estructuras: **los ganglios basales**, involucrados en diferentes procesos motores y cognitivos; el hipocampo y la amígdala, sustratos esenciales para la memoria y la conducta emocional; el bulbo olfatorio; el tálamo, que es un *sitio de relevo* crítico para la información sensorial; el hipotálamo, que es la estructura organizadora central para la regulación de muchas funciones homeostáticas del cuerpo (Purves *et al.* 2007).

Una importante región controladora del movimiento son los ganglios basales. Un conjunto grande y funcionalmente diverso de núcleos que se ubican profundos en el interior de los hemisferios cerebrales (fig. 4). El subconjunto de estos núcleos que son relevantes para la explicación de la función motora involucra el caudado, el putamen y el *globus pallidus*. Otras dos estructuras, la *sustancia nigra* en la base del mesencéfalo y el núcleo subtalámico en el tálamo ventral, están íntimamente asociadas con los ganglios basales (Purves *et al.* 2007).



**Figura 4. Ganglios basales, núcleos importantes en las funciones motoras.**  
Representación de su ubicación anatómica y de la vía nerviosa más importante en la que participan *Imagen modificada [www.maclester.edu].*

Los núcleos motores de los ganglios basales se dividen en varios grupos que son funcionalmente distintos. El primero y más grande es el cuerpo estriado e incluye al caudado y al putamen. Estas subdivisiones comprenden las zonas de aferencias de los ganglios basales, sus neuronas son el destino de la mayor parte de las vías que alcanzan este complejo desde otras partes del encéfalo. El cuerpo estriado lleva ese nombre gracias a los *fascículos* que lo atraviesan y le dan una apariencia estriada. Los destinos de los axones que provienen de la corteza son las dendritas de una clase de células denominadas neuronas espinosas medianas en el cuerpo estriado. Los axones que nacen de ellas convergen sobre neuronas



del *globus pallidus* y la *sustancia nigra pars reticulata*. Tales son las fuentes principales de eferencias del complejo de los ganglios basales.

Hay dos circuitos principales dentro del sistema de los ganglios basales. Las proyecciones desde las neuronas espinosas medianas del núcleo caudado y el putamen hasta el segmento interno del *globus pallidus* y la *sustancia nigra pars reticulata* forman parte de la “vía directa” y sirven para liberar las neuronas motoras de la inhibición *tónica*. Una segunda vía o ruta alternativa de conexión sirve para aumentar el nivel de inhibición *tónica* y se denomina “vía indirecta”, sirve para modular acciones desinhibidoras de la vía directa (Purves *et al.* 2007).

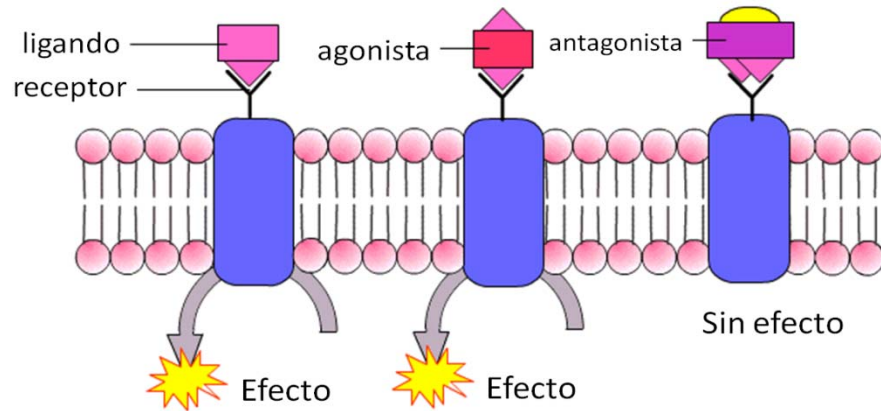
### 3.1.1 Receptores

En el encéfalo humano la mayoría de las neuronas se comunican entre sí liberando mensajeros químicos denominados neurotransmisores (Purves *et al.* 2007). Estos actúan sobre receptores proteicos específicos de la membrana plasmática de las neuronas postsinápticas donde provocan respuestas eléctricas específicas que inician cuando un PA llega a la terminal de una neurona presináptica y terminan cuando la respuesta en la célula postsináptica se completa (Randall *et al.* 2002).

Los receptores pueden estar integrados por una o varias subunidades, para funcionar de manera adecuada se valen de otro tipo de moléculas formando complejos que promoverán o inhibirán la actividad de los mismos (fig. 5). Aquella sustancia endógena o exógena que se liga al receptor y genera algún tipo de respuesta recibe el nombre de ligando. De la misma forma, cualquier sustancia que al interactuar con el receptor favorezca su actividad, recibe la designación de agonista. Puede tener distintos grados de afinidad con el receptor y, como consecuencia de esta unión, produce cambios conformacionales en él que llevan a que se cumpla el efecto biológico, es decir, el agonista posee actividad intrínseca o eficacia. Por el contrario, aquel compuesto endógeno o exógeno que impide la acción del agonista, se denomina antagonista. (Uribe-Mutis 1998).

Dependiendo del modo en que impidan la acción del agonista, los antagonistas pueden clasificarse en competitivos, no-competitivos o agonistas parciales. El antagonista competitivo se une al mismo receptor que el agonista, pero a diferencia de este último, no provoca respuesta. De ahí que ambas moléculas compitan por ocupar el sustrato. Este antagonista reduce la afinidad aparente del agonista pero no modifica su actividad intrínseca.

Los agonistas parciales son compuestos con afinidad por el receptor pero con una mejor eficacia que el agonista. Un agonista parcial con alta afinidad puede inhibir competitivamente la acción del agonista verdadero. Sin embargo, dependiendo de la concentración, el agonista parcial puede actuar como agonista o antagonista.



**Figura 5.** Representación de la interacción de los receptores de membrana y los diferentes componentes que a ellos se unen, así como la respuesta que desencadenan *Imagen modificada*  
 [http://www.cienciaboy.org.ar].

El antagonista no-competitivo (o *alostérico*) no actúa en el receptor del agonista sino en otro receptor íntimamente relacionado con él y necesario para que el agonista pueda desencadenar su efecto. Este tipo de antagonismo no se puede revertir al aumentar la concentración del agonista; por consiguiente, el antagonista no-competitivo da lugar a una disminución progresiva del efecto máximo, sin modificar la afinidad del agonista por el receptor (Uribe-Mutis 1998).

### 3.1.2.1 Receptores Glutamatérgicos

Los receptores glutamatérgicos pertenecen tanto al tipo de los ionotrópicos como a los metabotrópicos. Los primeros, son canales catiónicos cuya apertura se potencia cuando el glutamato (Glu) se une al receptor; en los segundos, en cambio, no hay flujo de iones, sino que activan enzimas intracelulares a través de proteínas G cuando se les une el neurotransmisor.

En los receptores ionotrópicos tanto el sitio de unión al agonista como el canal iónico están incorporados en el mismo complejo macromolecular. La unión del agonista provoca un cambio conformacional en el receptor que incrementa la probabilidad de que se abra el canal. El nombre de estas distintas clases de receptores les fue dado según el agonista selectivo al que respondían: *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y de kainato (KA), siendo diferente la afinidad del Glu hacia cada uno de ellos.

Los receptores metabotrópicos son encargados de modular la transmisión sináptica; se han descrito ocho tipos agrupados en tres clases diferentes que, al igual que en el caso anterior, se les nombra según el agonista que actúa sobre

ellos: 3,5-hidroxifenilglicina (DHPG), 2R4R-4-aminopirrolidina-2-4-dicarboxilato (APDC) y L-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4).

Los receptores AMPA como los NMDA están distribuidos a través de la *densidad postsináptica* (DPS), mientras que los metabotrópicos se ubican en la periferia (Hassel & Dingledine 2006). Son los receptores ionotrópicos, y no los metabotrópicos, los que estarán encargados de disparar las respuestas en la célula postsináptica a través de un potencial postsináptico.

### 3.1.2.1.1 Receptores *N*-metil-*D*-aspartato

Se trata de canales embebidos en la membrana, altamente permeables tanto a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de una manera voltaje-dependiente, que poseen varios sitios regulatorios que afectan alostéricamente la apertura de canales mediada por Glu (Coyle & Puttfarcken 1993). Estos corresponden a sitios de reconocimiento para dos agonistas (Glu y Gly) y un sitio regulatorio de poliamina, los cuales promueven la activación de receptores y diferentes sitios de reconocimiento para  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{H}^+$ , que actúan inhibiendo el flujo iónico a través de receptores que se han unido al agonista (Hassel & Dingledine 2006).

Los agonistas de receptores NMDA son típicamente aminoácidos dicarboxílicos de cadena corta como el Glu, aspartato y NMDA. Siendo el Glu el más potente de los agonistas endógenos que actúa en el cerebro de mamíferos. A pesar de que el NMDA es sumamente selectivo para este tipo de receptores, es 30 veces menos potente que el Glu.

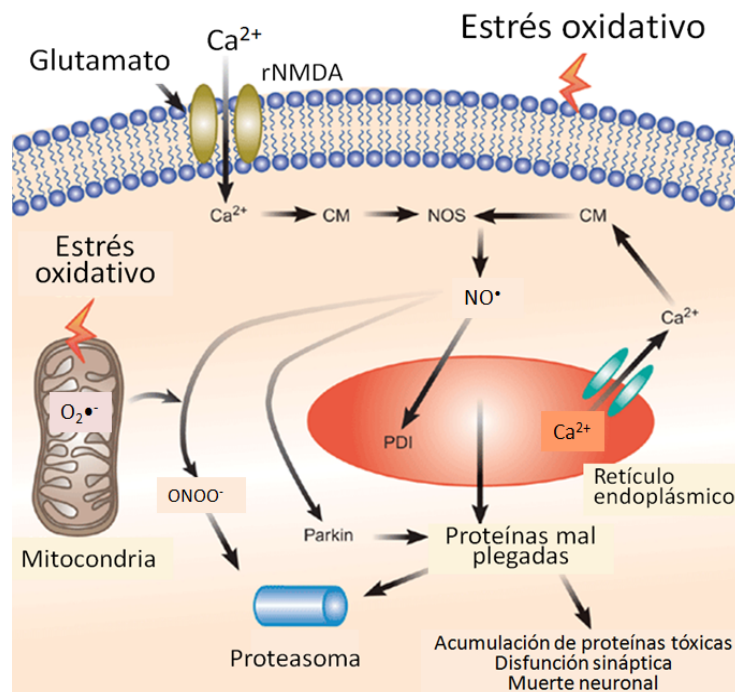
La activación de estos receptores requiere de la unión de dos diferentes agonistas: además del sitio de unión típicamente ocupado por el Glu, se requiere la unión de Gly. Dado que ninguno de los dos aminoácidos es capaz de inducir la apertura del canal por sí solo, se les conoce como coagonistas de los receptores NMDA. El sitio de unión de la Gly a estos receptores es farmacológicamente distinto del receptor clásico del neurotransmisor inhibitor.

Mientras que Gly y Glu activan los receptores, el  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular bloquea los canales dependientes de voltaje. También existe una inactivación de los receptores a través de la calmodulina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hassel & Dingledine 2006).

## 3.2 ESTRÉS OXIDANTE Y NITROSATIVO

La vida en el planeta surgió en un ambiente reductor, pero esta condición fue modificándose con la aparición de bacterias fotosintéticas. La estrategia evolutiva para sobrevivir en un ambiente oxidante consistió en restringir la transferencia de electrones a un aceptor final. La mayor parte de los electrones en el metabolismo energético son transferidos al  $\text{NADP}^+$  para producir NADPH, molécula que es resistente a la reacción con oxígeno. Además de los

intentos evolutivos para evitar la síntesis de productos reactivos en el metabolismo oxidante, también se comenzaron a sintetizar y acumular moléculas antioxidantes, muchas de las cuales evolucionaron, logrando eliminar de manera más eficiente las especies tóxicas a través de su catálisis (McCord 2000). Los sistemas biológicos son continuamente enfrentados a moléculas prooxidantes que pueden ser generadas de manera exógena o endógena, pero todos los tejidos están protegidos contra ellas con moléculas antioxidantes enzimáticas y no-enzimáticas (Pryor & Godber 1991).

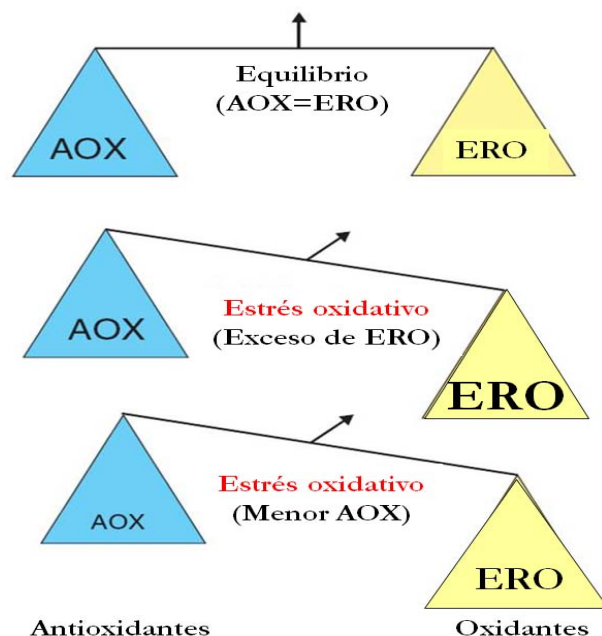


**Figura 6. Consecuencias del EO y EN en una célula tipo.** Eventos de EO asociados a alteraciones en la membrana y la disfunción mitocondrial promueven el flujo excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptores NMDA (rNMDA). Este ión se une a la calmodulina (CM), la cual activa la óxido nítrico sintasa (NOS), resultando en la producción de óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). Al reaccionar  $\text{NO}^{\bullet}$  con anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) produce una especie sumamente reactiva, el peroxinitro ( $\text{ONOO}^-$ ). También puede nitrosilar proteínas o provocar el mal plegamiento de las mismas. Algunas de ellas serán degradadas en el proteasoma, otras disminuirán la viabilidad celular por diferentes mecanismos. (Mattson 2006).

En años recientes se ha observado que el EO y el estrés nitrosativo (EN) desempeñan un papel determinante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, ya que no sólo son responsables de alterar la estructura y función de diversas biomoléculas, sino que también son los causantes de producir radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), que a su vez sirven como mediadores potenciales de activación de cascadas de señalización que llevan a la muerte neuronal (Santamaría & Jiménez 2005). Continúa la disyuntiva en saber si el EO y EN son consecuencia de los procesos degenerativos o eventos primarios que contribuyen integralmente a la

etiología de la enfermedad (Coyle & Puttfarcken 1993; Santamaría & Jiménez 2005; Sayre *et al.* 2007).

El EO se refiere a una condición nociva para las células (fig. 6) que es ocasionada por los radicales del oxígeno generados como productos del metabolismo (Coyle & Puttfarcken 1993), también se refiere al desbalance entre los procesos bioquímicos que permiten la producción excesiva de ERO y aquellas moléculas responsables de la remoción de los mismos: los sistemas de defensa antioxidante (fig. 7).



**Figura 7.** Representación gráfica de los sucesos que desembocan en EO. AOX, antioxidantes; ERO, especies reactivas de oxígeno (Scandalios 2002).

Por tanto, el EO incrementa los procesos oxidantes y disminuye las defensas antioxidantes (Scandalios 2002; Turrens 2003; Sayre *et al.* 2007). Tomando en cuenta cómo o dónde son generadas estas moléculas, un incremento en las concentraciones intracelulares provoca daños a muchos de sus componentes y la activación de diferentes rutas de señalización que llevan a la pérdida de las funciones celulares y, finalmente, a la muerte (Scandalios 2002). Las principales limitantes de los productos de defensa endógenos son su tamaño, el cual limita su permeabilidad a la célula, su vida media corta y su antigenicidad, por mencionar algunas (Patel & Day 1999). El EN hace referencia a procesos similares pero donde los actores son las ERN.

Ambos fenómenos se incrementan con la edad en el cerebro y las neuronas se ven particularmente afectadas dado que son células postmitóticas y su habilidad para responder al daño oxidante también declina (Andersen 2004).

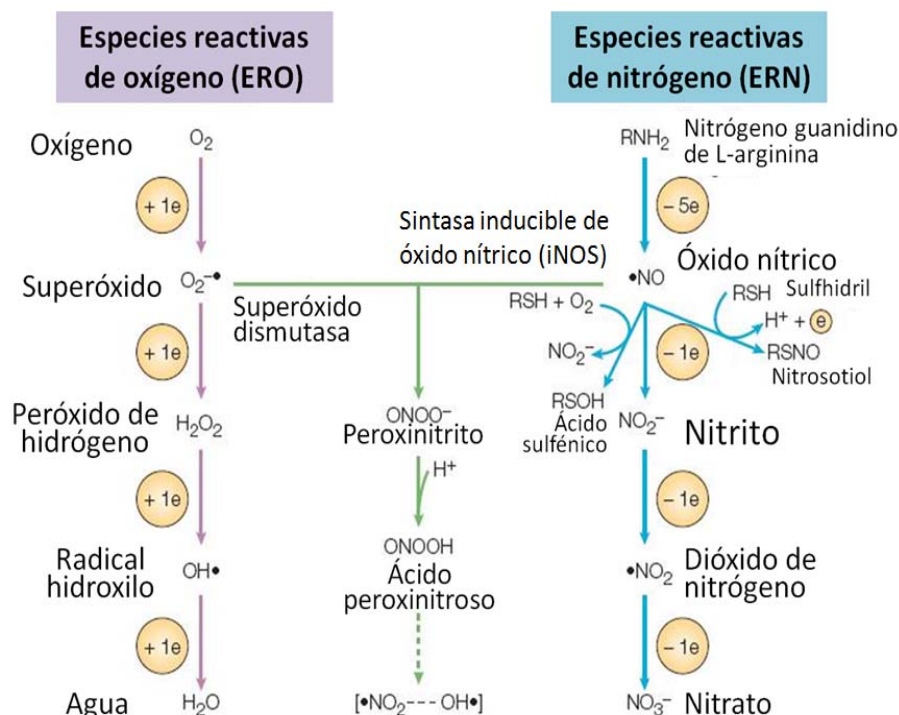
### 3.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno

El término especies reactivas (ER) se ha creado para incluir no sólo a las ERO, sino también a las de nitrógeno (ERN), de cloro (ERC), de bromuro (ERB) y de azufre (ERA) (Abuja & Albertini 2001; Halliwell 2006). Las ERO hacen alusión a una variedad de moléculas y radicales libres derivadas del oxígeno molecular (Turrens 2003), generalmente son producidas en la mitocondria al ocurrir una transferencia electrónica incompleta en el proceso de readucción del  $O_2$  a  $H_2O$ , es decir, las ERO son producto de la respiración celular (Scandalios 2002; Ott *et al.* 2007). A la pérdida de electrones se le conoce como oxidación. Los aductos generados de esta manera son conocidos como radicales libres, especies químicas capaces de existencia independiente que contienen uno o más electrones desapareados, los cuales tienden a donar tal electrón a otras moléculas, causando daño oxidante (Halliwell 1992; Sas *et al.* 2007). Muchos radicales libres existen *in vivo*, siendo de particular interés aquellos derivados del oxígeno (Halliwell 2006).

Las ERO son producidas en todos los organismos aerobios en el interior de la célula, normalmente en balance con las moléculas antioxidantes (Scandalios 2002). La naturaleza de los radicales varía, son capaces de reaccionar con muchas moléculas y generar un amplio espectro de respuestas: 1) si un radical se encuentra con un no-radical, se genera una especie que también cuenta con un electrón desapareado; 2) el radical puede ser un agente reducido y donar su electrón; 3) el radical puede ser un agente oxidante y tomar un electrón de un no-radical; 4) un radical puede abstraer un átomo de hidrógeno formando un puente C-H (Halliwell 2006). No todas las ER son radicales, pero en muchos casos las ER no radicales se comportan como tales dañando biomoléculas a través de procesos de oxidación, que resulta en la formación de radicales verdaderos, capaces de propagar la reacción y extender el daño (Abuja & Albertini 2001). Los agentes oxidantes derivados del óxido nítrico ( $NO^*$ ), por su parte, se conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Turrens 2003). Entre las principales se encuentran el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), la nitrógeno guaninino L-arginina ( $RNH_2$ ), el nitrito ( $NO_2^-$ ), el nitrosotiol ( $RSNO$ ), el ácido sulfénico ( $RSOH$ ), el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y el nitrato ( $NO_3^-$ ) (Fang 2004).

ERO y ERN (fig. 8) juegan papeles cruciales en procesos fisiológicos y patofisiológicos. Quizá el proceso biológico en el que destaque más su participación sea en la transducción de señales. Sin embargo, su producción moderada se ve involucrada en la neurotransmisión, en eventos de proliferación celular y apoptosis. Las ERN tienen importancia en la homeostasis vascular (Fang 2004). En pequeñas concentraciones, los radicales protegen, previenen o reducen la destrucción oxidativa de las biomoléculas (Abuja & Albertini 2001). Cuando los radicales libres son producidos en exceso causan daño a los tejidos,

este daño puede generar aún más radicales, lo cual empeorará el estatus de la célula (Halliwell 1992), generando reacciones en cadena con indiscriminados objetivos hacia proteínas, lípidos, polisacáridos y DNA (Turrens 2003). Los radicales libres son los responsables de los efectos tóxicos del oxígeno (Fang 2004).



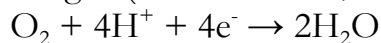
**Figura 8.** Principales ERO yERN que desencadenan eventos de EO y EN (Fang 2004).

El oxígeno diatómico ( $O_2$ ) se encuentra en un estado de birradicalidad o de triplete debido a que cuenta con un par de electrones desapareados localizados en orbitales diferentes pero con el mismo spin. El spin paralelo es una de las razones de la pobre reactividad de esta molécula a pesar de su poderosa naturaleza oxidante. Esta restricción es la que aminora la reacción de  $O_2$  con moléculas no radicales, es decir, sólo puede reaccionar con un electrón a la vez y es entonces cuando la molécula se vuelve más reactiva; si uno de estos electrones es excitado y cambia su spin, la especie resultante (conocida como oxígeno singlete) se convierte en un poderoso agente oxidante por el hecho de que ahora los electrones cuentan con spin diferente, permitiendo la interacción directa con enlaces covalentes (Halliwell 1992; McCord 2000; Turrens 2003; Halliwell 2006). El oxígeno singlete puede formarse durante la peroxidación lipídica (PL) y contribuir al daño debido a su habilidad de oxidar lípidos, proteínas y DNA (Halliwell 2006).

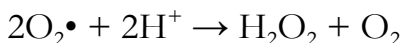
Muy pocas enzimas son capaces de lidiar con el  $O_2$  a pesar de que nuestro esquema bioenergético es completamente dependiente de la transferencia de



electrones a este aceptor; de hecho, más del 80% del O<sub>2</sub> que manejamos es utilizado por la citocromo oxidasa, una enzima mitocondrial que participa en la fosforilación oxidativa que adiciona cuatro electrones a la molécula de oxígeno para generar dos moléculas de agua (Halliwell 1992; McCord 2000).



La transferencia de un electrón produce intermediarios inestables (Turrens 2003). El anión superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) es la primera especie resultante tras la adición de un electrón precursor de la mayoría de las ERO, mediador en las reacciones de oxidación y el mayor agente responsable de la toxicidad del oxígeno. Su dismutación puede ser espontánea o catalizada por una familia de metaloenzimas llamada superóxido dismutasa (SOD) que produce peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), molécula que puede ser reducida completa o parcialmente a agua, produciendo el radical hidroxilo (OH•) (Halliwell 1992; Turrens 2003). La dismutación espontánea es facilitada por niveles bajos de pH (Turrens 2003). En el cerebro, SOD representa la mayor defensa antioxidante (Herrera-Mundo *et al.* 2006). Remueve el O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> convirtiéndolo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; hace reaccionar dos radicales superóxido, oxidándose unos a otros (Halliwell 1992; McCord 2000) y disminuyendo el riesgo de que ocurra la formación de OH• (Coyle & Puttfarcken 1993).



A diferencia del O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cruza las membranas celulares muy fácilmente. No obstante, esta molécula no califica como radical porque no contiene electrones desapareados. Puede ser removido a través de dos enzimas: la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) selenio-dependiente, siendo esta última la más importante en el cerebro (Halliwell 1992; Scandalios 2002). La remoción ocurre reduciendo la molécula a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (Coyle & Puttfarcken 1993).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula sumamente tóxica en muchos sistemas, particularmente en el sistema nervioso, pero su toxicidad no está mediada por un efecto directo, sino que es precursora de otras especies altamente oxidantes capaces de dañar el tejido. Además, reacciona con los iones de Fe<sup>2+</sup> para formar el radical OH• a través de la reacción de Fenton (Halliwell 1992).



La autooxidación de sustancias endógenas concentradas en ciertos sistemas neuronales también lleva a la formación de OH• (Coyle & Puttfarcken 1993). Uno de sus efectos devastadores es la acción que lleva a cabo en los lípidos de membrana, un proceso llamado PL.

Otro radical libre producido por diversos tipos celulares es el NO•. Está involucrado en el funcionamiento normal de aminoácidos excitadores y el daño producido por su generación en exceso. Este radical es capaz de reaccionar con O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> para producir una molécula no radical pero sumamente tóxica, el ONOO•.



### 3.2.2 Vulnerabilidad del Sistema Nervioso Central

El SNC cuenta con características anatómicas y metabólicas que lo hacen particularmente vulnerable al insulto oxidante. Entre ellas se encuentran: una alta tasa de utilización de  $O_2$ ; concentraciones pobres de antioxidantes comunes y una capacidad limitada de producción de los mismos; gran cantidad de lípidos de membrana y aquellos que recubren los axones y que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, sustrato ideal para la oxidación (especialmente zonas como el estriado y el cerebelo); una tasa metabólica aerobia elevada; la capacidad autooxidante de muchos neurotransmisores y su catálisis por enzimas que generan  $H_2O_2$ ; además del hecho de que muchas áreas del cerebro sean ricas en  $Fe^{2+}$ , metal que juega un papel importante en su correcto funcionamiento, pero también capaz de provocar la formación de radicales libres (Halliwell 1992; Coyle & Puttfarcken 1993; Abuja & Albertini 2001; Santamaría y Jiménez 2005; Sayre *et al.* 2007).

### 3.2.3 Daño neuronal

El sistema nervioso es susceptible de sufrir daños, ya sea por el proceso natural del envejecimiento, o por factores externos, como son las drogas y otras sustancias tóxicas o el desarrollo de neuropatologías. En esta tesis se hará referencia a dos características indicativas de que está ocurriendo o ha ocurrido daño neuronal: la PL y déficit en el metabolismo energético, ambos procesos están vinculados fuertemente a muchas enfermedades neurodegenerativas y alteraciones provocadas por EO.

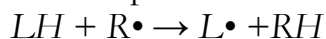
El EO no puede ser medido en términos universales, lo que se puede hacer es evaluar el estado oxidante con base en potencial oxidante/reductor de una especie dada, evaluando la actividad de la mitocondria, o bien, en la susceptibilidad de varios compuestos a la peroxidación (Dotan *et al.* 2004). Sin embargo, el daño causado por EO no necesariamente involucra la PL. El daño al DNA y a las proteínas puede ser igual o incluso de mayor importancia en circunstancias *in vivo*. En el primer caso ocurre la activación de poli (ADP-ribosa) sintetasa que lleva a la disminución de  $NAD^+$  celular, disminución del ATP, incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y a la postre activación de proteasas (Halliwell 1992). El daño oxidante al DNA provoca la modificación de las bases púricas y pirimídicas, al esqueleto de desoxirribosa, rupturas a las cadenas dobles o sencillas, así como un entrecruzamiento entre las moléculas; además, las modificaciones al DNA son potencialmente mutagénicas (Ott *et al.* 2007).

### 3.2.3.1 Peroxidación Lipídica

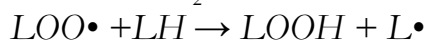
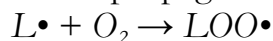
Es un proceso deletéreo que afecta los lípidos de membranas como resultado del ataque de radicales libres (Jara-Prado *et al.* 2003). Los sustratos de la PL son usualmente ácidos grasos poliinsaturados; los ácidos grasos saturados o monoinsaturados son mucho menos reactivos y raramente participan en dicho evento. Un solo radical induce la oxidación de una amplia gama de moléculas (Abuja & Albertini 2001; Dotan *et al.* 2004).

Una membrana cuyos lípidos han sido peroxidados se torna rígida, pierde la función de sus canales y es incapaz de preservar su integridad. La interrupción en la permeabilidad de la membrana o su fragmentación lleva a un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la irreversible destrucción celular. La PL está involucrada en la excitotoxicidad mediada por receptores NMDA (Jara-Prado *et al.* 2003). La incorporación del oxígeno molecular a ácidos grasos poliinsaturados (LH) es el primer paso de una cadena de reacciones que lleva a la formación de hidroperóxidos diénicos conjugados. Más frecuentemente, la sustracción de un átomo de hidrógeno a un grupo metileno reactivo que forme parte de un residuo de ácido graso poliinsaturado por medio de algún radical ( $\text{R}\cdot$ ) o especie reactiva (Janero 1990; Abuja & Albertini 2001; Dotan *et al.* 2004). El proceso completo consta de tres etapas: la iniciación, que ocurre al formarse el radical lipídico ( $\text{L}\cdot$ ); en la segunda fase, llamada propagación, el  $\text{O}_2$  se agrega rápidamente al  $\text{L}\cdot$ , llevando a la generación del radical peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ), el cual puede robar un hidrógeno a otro ácido graso poliinsaturado, haciéndose una secuencia de reacciones interminables. El lípido hidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ) es el primer producto de la PL. La última fase es la terminación, que ocurre cuando dos radicales se encuentran, generando una molécula estable, un producto no-radical (PNR) (Abuja & Albertini 2001).

Iniciación de la peroxidación lipídica



Fase de propagación



Fase de terminación



Los iones de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  aceleran la PL a través de la reacción de Fenton, dando un radical alcoxi ( $\text{LO}\cdot$ ) y más radicales peroxil ( $\text{LOO}\cdot$ ) (Halliwell 2006).

La formación y degradación de todos estos productos lipídicos peroxidados son usados para evaluar el EO (casi siempre asociado con alguna enfermedad), comúnmente expresados como dienos conjugados o como MDA (Dotan *et al.* 2004).

### 3.2.3.2 Caída de la Actividad Mitocondrial

La disfunción mitocondrial afecta conspicuamente aquellos tejidos con gran demanda energética, principalmente el cerebro y el músculo. El cerebro es un caso muy particular, pues a diferencia de otros tipos celulares, las neuronas no pueden realizar la glucólisis cuando la fosforilación oxidativa es limitada (Knott *et al.* 2008), misma que tiene lugar en el organelo en cuestión. Durante las primeras etapas del metabolismo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la  $\beta$ -oxidación y la glucólisis resultan en la generación de nicotidamín adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavina adenina dinucleótido reducido (FADH<sub>2</sub>). Cada uno de estos co-factores aporta un par de electrones con un alto potencial de transferencia y su oxidación resulta en la producción de sus equivalentes reducidos, acción que se lleva a cabo por el complejo I, en el caso de la NADH y por el complejo II, si se trata de FADH<sub>2</sub>. Una vez reducidos son acarreados por los transportadores de electrones hacia la ubiquinona. Los electrones pasan al complejo III, al citocromo c, al complejo IV y finalmente al oxígeno, el cual es reducido hasta agua. Este flujo permite el bombeo de protones fuera de la matriz mitocondrial y la generación de lo que se conoce como fuerza protón-motriz, usada por el complejo V para generar ATP (Hart & Schapira 1999).

Cualquier anomalía en la secuencia de estos eventos puede alterar la adecuada función de las células. El abatimiento en la producción de ATP, el EO y la inducción de apoptosis son algunas de las consecuencias cuando hay falla en la mitocondria (Sas *et al.* 2007). Se ha especulado que el incremento de Glu en ocasiones es provocado por disfunciones metabólicas, mecanismos preponderantes en la neurodegeneración. La disfunción mitocondrial también altera la homeostasis neuronal del Ca<sup>2+</sup>, el intercambio Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, el secuestro mitocondrial o por parte del retículo endoplásmico de Ca<sup>2+</sup> y la actividad de la ATPasa del mismo ión; además, se induce a la producción y desintoxicación anormal de radicales libres, potenciando la activación de canales iónicos (Greene *et al.* 1998). A partir de estos postulados se generó la “hipótesis de la excitotoxicidad secundaria” (Pang & Geddes *et al.* 1997), la cual explica los mecanismos por los cuales la interrupción metabólica lleva a la excitotoxicidad. La disminución en los niveles de ATP resulta de la atrofia en las funciones de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y la subsecuente despolarización de la membrana, la cual lleva a la remoción voltaje-dependiente del Mg<sup>2+</sup> que se encuentra bloqueando el canal de los receptores NMDA induciendo, de esta manera, una activación tóxica de los receptores ante concentraciones normales de Glu. Por otra parte, las alteraciones metabólicas pueden hacer a las neuronas incapaces de funcionar con la actividad normal de los rNMDA, de ahí que se induzca un aumento en la conductancia del Ca<sup>2+</sup>, con las consecuentes alteraciones en la concentración

intracelular de este ión, es decir, la inhibición metabólica exagera la neurotoxicidad dependiente de receptores NMDA (Greene *et al.* 1998).

La formación de ERO con la consecuente PL puede llevar a la supresión del metabolismo mitocondrial (Ott *et al.* 2007).

Resulta crucial mencionar que para fines prácticos, en esta tesis se hace referencia a la caída de la actividad mitocondrial en términos de la capacidad reductora del complejo II de la cadena respiratoria. Cuando hay un cese de ésta es porque ha ocurrido una inhibición de la enzima y, por ende, una interrupción del metabolismo energético, que producirá algunos de los efectos ya mencionados.

### 3.3 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Uno de los desórdenes en los cuales el EO y EN así como las ERO y ENO juegan un papel determinante es la EH. Nombrada así en 1872 por George Huntington, quien describió un grupo de pacientes que presentaban de manera gradual defectos en el comportamiento, la cognición y el movimiento (Purves *et al.* 2007).

Se trata de un mal asociado con la degeneración de neuronas estriatales de los ganglios basales (Santamaría y Jiménez 2005). Este desorden es resultado de la mutación de una secuencia altamente conservada en el brazo corto del cromosoma 4, cuyo locus originalmente mapeado fue 4p16 (Bertram & Tanzi 2006) y es transmitido de manera autosómica dominante (Gusella *et al.* 1983; Santamaría & Jiménez 2005) en el 90% de los casos, mientras que en el 10% restante se considera que se origina *de novo*, ya que proviene de padres asintomáticos (Bertram & Tanzi 2006). El gen responsable de esta enfermedad, gen *HTT*, codifica para una proteína de 350 kDa, la huntingtina (altamente conservada) (Bertram & Tanzi 2006), que cuenta con una forma citosólica y una nuclear, ambas asociadas con microtúbulos y vesículas sinápticas. De manera normal es ampliamente expresada en el sistema nervioso y en tejido no neuronal. Tiene una función crítica en el desarrollo temprano y puede jugar un papel importante en el transporte axonal (Wichmann & DeLong 2006).

En los pacientes con EH se degeneran las neuronas espinosas medianas que se proyectan hasta el segmento externo del *globus pallidus*. En ausencia de aferencias inhibitorias normales desde las neuronas espinosas, las células del *globus pallidus externo* se tornan anormalmente activas; esta actividad reduce las eferencias excitadoras del núcleo subtalámico hacia el *globus pallidus interno*. En consecuencia, se reducen las eferencias inhibitorias de los ganglios basales. Sin la influencia limitante de los ganglios basales, las neuronas motoras superiores pueden ser activadas por señales inapropiadas, lo que conduce a movimientos

balísticos y coreicos (similares a un baile) no deseados, mismos que caracterizan esta enfermedad (Purves *et al.* 2007).

### 3.3.1 Modelos de la Enfermedad de Huntington

Se han diseñado diferentes maneras de abordar el complejo problema que significa la neurodegeneración presentada en la EH. Más allá del simple entendimiento y dado que se trata de un mal que afecta al humano, el enfoque del modelo de estudio ha sido con fines terapéuticos. Los tipos de modelos más explotados se reducen prácticamente a dos: modelos de manipulación genética y modelos fenotípicos.

Los modelos de manipulación genética están basados mayoritariamente en ratas, ratones y primates debido al alto grado de analogía que guardan con los humanos y a la practicidad en su manipulación. Todos ellos son muy relevantes pues imitan cercanamente los síntomas clínicos y neurobiológicos de la EH (Borlongan *et al.* 1997). Son los modelos murinos los que han sido más arduamente investigados. Existen ratones *knock-in*, en los cuales se provoca la mutación en un gen endógeno (Reddy *et al.* 1999), o sea, en el gen *Hdh* que codifica para la huntingtina en el ratón (Menalled & Chesselet 2002). Estos estudios se realizaron con la finalidad de comprender si el contexto de la secuencia de la proteína es importante para la toxicidad de la poliglutamina (Reddy *et al.* 1999). Ordway y colaboradores en 1997 desarrollaron un modelo con 146 repeticiones de CAG que insertaron en el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa de ratón, proteína no involucrada con ningún tipo de desorden provocado por expansión de la glutamina. El ratón mutado expresó la poliglutamina en tal proteína y en la etapa adulta desarrolló un fenotipo neurológico que lo condujo a la muerte. Con este trabajo se pudo demostrar que la poliglutamina *per se* tiene efectos nocivos. Otro estudio del tipo *knock-in* se hizo al expandir 50 veces el triplete CAG en el gen *Hdh* del ratón, homólogo al *HTT* de humanos, observando que no se produjo ningún cambio de tipo conductual o patológico en los animales (White *et al.* 1997). Sin embargo, en líneas de ratones donde se encendió el gen de la neomicina en el exón 1 como parte de la estrategia, se obtuvo que cuando los roedores eran homocigotos tenían un desarrollo cerebral aberrante, pero los de condición heterocíga no presentaban ninguna anomalía (White *et al.* 1997).

También están los ratones *knock-out*, que involucran la anulación de la expresión del gen. Entre los avances obtenidos se tiene que en todos los casos, el fenotipo homocigoto fue letal durante la embriogénesis (Zeitlin *et al.* 1995; Brouillet *et al.* 1999; Reddy *et al.* 1999). Los ratones heterocigotos para *Hdh* mostraron dos vertiente en cuanto a fenotipo se refiere; una línea resultó normal, mientras que en la otra, los ratones presentaron alteraciones motoras, déficit

cognitivos y una pérdida neuronal significativa en los núcleos subtalámicos (Nasir *et al.* 1995; Brouillet *et al.* 1999). A pesar de lo poco esclarecedores que resultaron estos estudios, al menos se pudo confirmar que la EH no es causada por la simple pérdida de una función proteica (Brouillet *et al.* 1999).

Finalmente, están los ratones transgénicos, donde el gen mutado foráneo es introducido (Reddy *et al.* 1999). De este último tipo de animales hay dos casos generales, aquel en el que se expresa el exón-1 del gen humano de la huntingtina (*HTT*) y otro en el que se expresa el gen *HTT* en su totalidad, las dos líneas de ratones poseen además ambos alelos silvestres de la huntingtina de ratón (Beal & Ferrante 2004). Entre los avances en este campo destacan la generación de varios ratones que contienen 44 tripletes CAG de cDNA, o bien, cepas con el exón 1 del brazo corto del cromosoma 4 mutado, que generan entre 115 y 156 copias de CAG. Seis líneas (CAG)<sub>44</sub> resultaron exitosas; en dos de ellas se encontraron altos niveles del mRNA transgénico sin que se expresara la proteína mutada y todos presentaban un fenotipo normal (Goldberg *et al.* 1996; Mangiarini *et al.* 1996; Brouillet *et al.* 1999; Reddy *et al.* 1999). Por otra parte, tres líneas con el exón 1 mutado, se expresaban ampliamente tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína; en estos casos los defectos neurológicos sí se apreciaban (Brouillet *et al.* 1999).

El primer transgénico exitosamente generado fue aquél que contenía la sobreexpresión del exón 1 del gen que codifica para la huntingtina en humanos; a esta cepa de ratones se le llamó R6 (Mangiarini *et al.* 1996; Menalled & Chesselet 2002). Muchas líneas se generaron a partir de los R6, pero las más trabajadas debido a su eficiencia, son la R6/2 que provocan deficiencias motoras a las 4 ó 5 semanas posteriores al nacimiento, otras anomalías aparecen hasta las 8 semanas, encontrando la muerte tempranamente, entre las 10-13 semanas. El fenotipo que presentan es severo, incluye la pérdida de peso, diabetes, rigidez, temblores y convulsiones (Mangiarini *et al.* 1996, Carter *et al.* 1999; Hurlbert *et al.* 1999; Menalled & Chesselet, 2002). Una autopsia demostró una evidente pérdida de peso en el tejido cerebral, no obstante, la muerte neuronal fue mínima (Hurlbert *et al.* 1999; Menalled & Chesselet, 2002). La otra línea de ratones que resultó altamente eficiente como modelo de estudio fue la R6/1. Estos ratones muestran un curso más progresivo de la enfermedad, en algún momento llegan a presentar inclusiones nucleares (Davies & Scherzinger 1997; Menalled & Chesselet 2002). Las mayores diferencias entre R6/1 y R6/2 son la expansión del triplete CAG (115 vs 150), siendo esta última más agresiva (Davies & Scherzinger 1997; Cepeda *et al.* 2007); y la baja expresión del transgen mutado comparado con el silvestre, 31% contra 75% (Mangiarini *et al.* 1996; Menalled & Chesselet, 2002).

De manera general, son los modelos *knock-in* los que generan más contribuciones al entendimiento de cualquier enfermedad, no obstante, el

desarrollo de estrategias de este tipo no se han extendido lo suficiente, ya que su manejo es muy complejo y la viabilidad de los organismos es reducida, lo que lo vuelve un proceso sumamente costoso (Menalled & Chesselet 2002).

### 3.3.1.1 Modelos Fenotípicos

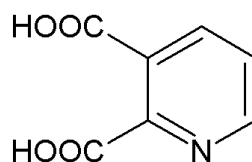
La terapia génica se ha convertido en el siguiente paso lógico para encontrar una cura a la EH; sin embargo, parece no estar disponible en el futuro cercano. Por ello, los modelos farmacológicos probados en animales se convierten en una alternativa bastante tangible (Borlongan *et al.* 1997). Los modelos fenotípicos hacen referencia a aquellos diseños experimentales donde a partir de una técnica cualquiera (que no implique manipulación genética) se induce una respuesta que se evidencia explícitamente en animales; en este caso, se reproducen características muy similares a las apreciadas cuando ocurre la EH.

Los modelos fenotípicos de la EH son las mejores estrategias, en términos prácticos, para proponer y probar nuevas terapias (Brouillet *et al.* 1999). Dos son los más estudiados debido a la fidelidad que guardan con el padecimiento; el del QUIN y el del 3-NP administrados a roedores. El QUIN es una sustancia endógena producida de manera natural durante el metabolismo de las kiruneninas (Santamaría y Jiménez 2005), mientras que el 3-NP es una toxina producida por el hongo *Arthrimum sp.* (Alexi *et al.* 1998; Silva-Adaya *et al.* 2008).

Ambos compuestos se parecen mucho en su modo de acción, ya que el QUIN tiene la capacidad de sobre-excitar los receptores NMDA, principalmente, pero también es capaz de provocar EO y anomalías en el metabolismo energético; mientras que el 3-NP se distingue por interrumpir el metabolismo a través de la inhibición irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH), aunque también puede provocar excitotoxicidad y EO (Silva-Adaya *et al.* 2008).

#### 3.3.1.1.1 Modelo del Ácido Quinolínico

El 2,3-piridina ácido dicarboxílico o QUIN es un metabolito endógeno del triptófano proveniente de la vía de las kinureninas (KYN), precursor del NAD<sup>+</sup> en los órganos periféricos de los mamíferos (Wolfensberger *et al.* 1983; Heyes *et al.* 1992; Santamaría y Jiménez 2005; Sas *et al.* 2007). Es un aminoácido heterocíclico (fig. 9) que ejerce acciones excitadoras en el sistema nervioso central de mamíferos (Wolfensberger *et al.* 1983).



**Figura 9.** Estructura química del ácido quinolínico *Imagen tomada de [http://commons.wikimedia.org].*

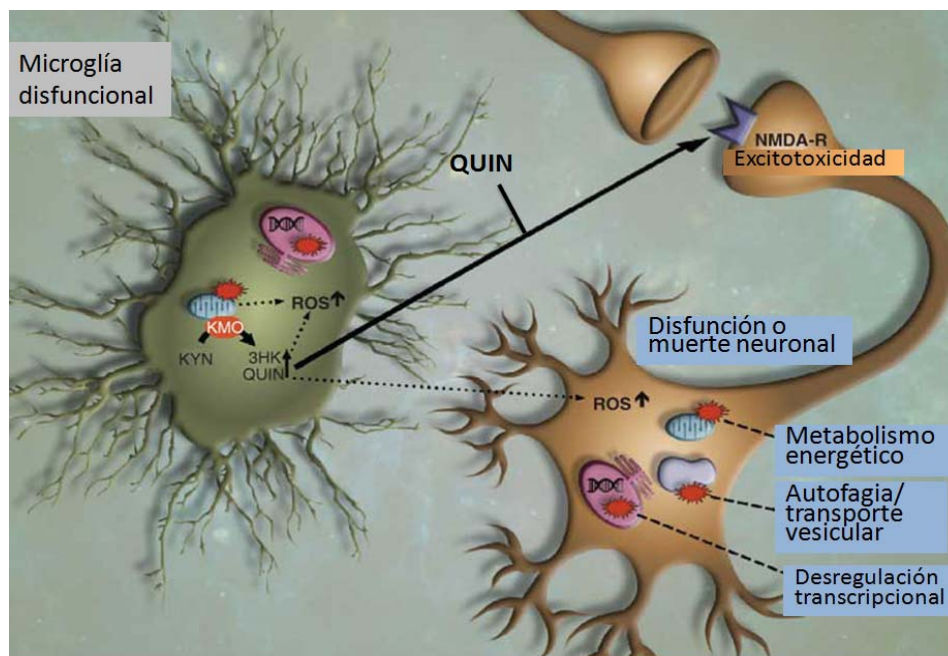
Generalmente actúa como agonista selectivo de los receptores NMDA (rNMDA), promoviendo eventos de excitotoxicidad a nivel estriatal y mecanismos de daño neuronal, tales como la disminución de GABA; la despolarización de la membrana con el excesivo incremento en las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$ ; el agotamiento de las reservas de ATP; la producción de radicales libres, EO y muerte neuronal (fig. 10). El QUIN induce la acumulación de  $\text{Fe}^{2+}$  y la formación del complejo QUIN- $\text{Fe}^{2+}$ , el cual promueve la reacción de Fenton y la generación de radicales libres. A diferencia de otros compuestos, es su cualidad de quelante la que explica su naturaleza oxidante (Pérez *et al.* 1996; Santamaría *et al.* 2001; Santamaría y Jiménez 2005; Sas *et al.* 2007). Al ser un agonista débil de los rNMDA, es capaz de ejercer sus efectos neurotóxicos a través de mecanismos independientes a ellos, como son el EO (ya que la formación del complejo QUIN- $\text{Fe}^{2+}$  media la generación de ERO y ERN), la alteración de algunos sistemas antioxidantes y la generación directa de ERO y ERN en el tejido nervioso completo (Pérez-De La Cruz & Santamaría 2007). Además, tiene la capacidad de modificar el *modus operandi* de antioxidantes endógenos como el glutatión (GSH) y su forma oxidada y la CuZn-SOD. Posee la habilidad de generar  $\text{OH}^{\bullet}$  durante las primeras etapas de toxicidad. Especies derivadas del nitrógeno como el  $\text{NO}^{\bullet}$  y  $\text{ONOO}^{-}$  están involucradas en la neurotoxicidad y daño oxidante inducido por QUIN (Santamaría y Jiménez 2005).

El QUIN administrado en animales se considera un modelo de daño excitotóxico, pero no sólo provoca ese tipo de alteraciones, también induce EO, EN y eventos de inflamación en el SNC sumado al déficit energético, aunque éste, es provocado a su vez, por la actividad reiterada de los receptores glutamatérgicos. Como ya se mencionó, forma parte del metabolismo y es fácilmente localizable en las células de la glía y los macrófagos. Estas células, en presencia de astrocitos, pueden contribuir indirectamente al daño neuronal, ya que constituyen un sustrato para la producción de QUIN. Este agonista selectivo de rNMDA está presente en el cerebro y en el líquido cefaloraquídeo de todos los mamíferos en concentraciones nanomolares que fluctúan entre 50-100 nM, niveles muy bajos en comparación con otros aminoácidos excitadores; se han percibido incrementos que alcanzan el orden de micromolares, en pacientes con desórdenes neurológicos con componentes inflamatorios e infecciosos (Wolfensberger *et al.* 1983; González-Cortés & Santamaría 2007; Sas *et al.* 2007).

En la EH se encuentran activados y regulados varios factores involucrados en procesos de inflamación. Entre ellos, células de la microglía, caspasa-1, caspasa-3, la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) y el factor NF- $\kappa$ B. De la misma forma, los compuestos del complemento están ampliamente expresados en el caudado de cerebros con EH (González-Cortés & Santamaría



2007); por ello, el QUIN es un excelente modelo de dicho padecimiento, dado que también es capaz de evocar cascadas de inflamación.



**Figura 10.** Efectos de la toxicidad mediada por QUIN (Giorgini et al. 2005).

Se ha evidenciado que después de haber recibido una infusión de QUIN, los estriados de rata presentan evidente microgliosis, astrigliosis y neurodegeneración. La activación de la microglia en respuesta a la neurotoxina es responsable de la expresión de la interleucina 6 (IL-6) y potencia el daño liberando más Glu y QUIN al dominio extracelular, facilitando de esta manera la excitotoxicidad. La toxina endógena, además, induce a los astrocitos a la producción de altas cantidades de la quimocina monocito quimioatrayente proteína-1 (MCP-1), proteína expresada en respuesta a estímulos proinflamatorios, principalmente por intervención del NF- $\kappa$ B.

Todos estos procesos activan factores de transcripción que, como ya se mencionó, producen mediadores de la inflamación capaces de estimular la respuesta de la microglía, generando un ciclo repetitivo de daño. Dichos eventos llevan a la muerte neuronal y a la consecuente gliosis reactiva. Es entonces cuando los astrocitos y la microglia activada liberan más citocinas, quimiocinas y otras moléculas proinflamatorias que afectan directamente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permiten la infiltración de leucocitos.

Aún es incierto si los niveles extracelulares de QUIN durante los eventos inflamatorios son lo suficientemente altos como para producir excitotoxicidad; sin embargo, experimentos *in vitro* demuestran que el QUIN puede estimular la liberación de Glu en fracciones sinaptosomales, inhibiendo además su recaptura

por los astrocitos y contribuyendo a un aumento en la concentración extracelular del neurotransmisor, lo que lleva a una sobre-estimulación de la transmisión glutamatérgica (González-Cortés & Santamaría 2007).

El uso de este metabolito de las KYN en diseños experimentales confirma su fidelidad al reproducir las características fenotípicas de la EH: los cambios producidos en los niveles de Glu, GABA y otros aminoácidos; peroxidación de lípidos; daño a la función mitocondrial y al DNA (Stone 2001). La administración aguda intraestriatal de QUIN (0.5-1  $\mu$ L a 240 nmol) sugiere que el QUIN daña un grupo selecto de células estriatales que incluyen respuestas rápidas y cambios premórbidos en la estructura del estriado y/o función de las neuronas relativas a la estructura. Además, evidencia un incremento de la actividad motora, aunado a la conducta de “giro de barril” (característica que no correlaciona del todo con aspectos clínicos) y convulsiones episódicas posteriores a la infusión de la toxina (Portera-Cailliau *et al.* 1995; Bazzet *et al.* 1996a).

Otros estudios arrojan que la inyección intraestriatal de 240 nmol/ $\mu$ L de QUIN induce respuestas de EO, lo cual sostiene la posible relación entre este fenómeno y la excitotoxicidad. Además se ha visto que concentraciones micromolares (20-100  $\mu$ M) favorecen la PL y disminuyen las defensas antioxidantes, indicando la capacidad intrínseca de la molécula para provocar EO a través de mecanismos independientes a los receptores NMDA (Schuck *et al.*, 2007).

En experimentos de corte conductual se han caracterizado lesiones unilaterales y bilaterales (a nivel estriatal) con QUIN; observando que con las unilaterales no se presentan anormalidades motoras espontáneas, sino que se necesita la estimulación de receptores dopaminérgicos por medio de algún agonista, lo que provoca una conducta aberrante de rotación, pero ninguna otra alteración motriz. Un elevado número de rotaciones es considerado como una característica análoga del síndrome hiperkinético. Además, la inyección bilateral induce hiperactividad nocturna persistente y espontánea (Brouillet *et al.* 1999). Es importante mencionar que en el caso de las lesiones unilaterales, el estriado ileso puede compensar las deficiencias neuroquímicas y/o funcionales. La administración crónica intraestriatal de esta sustancia provoca deficiencias en la memoria espacial, sugiriendo que emula los efectos cognitivos de la EH (Sas *et al.* 2007).

Schwarcz (1983) demostró que la inyección unilateral intraestriatal de QUIN  $\geq$ 150 nM a ratas provocaba movimientos tónico-clónicos en las extremidades superiores contralaterales a la lesión, acompañados por eventos esporádicos de giro de barril; a otro nivel, se detectó que la actividad de los elementos dopaminérgicos aumentó en el estriado. El análisis ultraestructural del estriado, 4 días después de haber infundido 60 nmoles de QUIN revelaron disturbios en el neuropilo y las neuronas, los cambios más conspicuos fueron un

hinchamiento de las dendritas y un decremento de los complejos sinápticos. Disminuyó la actividad estriatal de la ácido glutámico descarboxilasa y de la acetilcolintransferasa (enzimas participantes en la producción de GABA), también las neuronas colinérgicas lo hicieron de manera dosis-dependiente con respecto al QUIN. Estos estudios también permitieron elucidar que al inyectar al metabolito del triptófano directamente en el hipocampo existe una vulnerabilidad selectiva de las células piramidales comparada con las células granulares (Schwarcz *et al.* 1983).

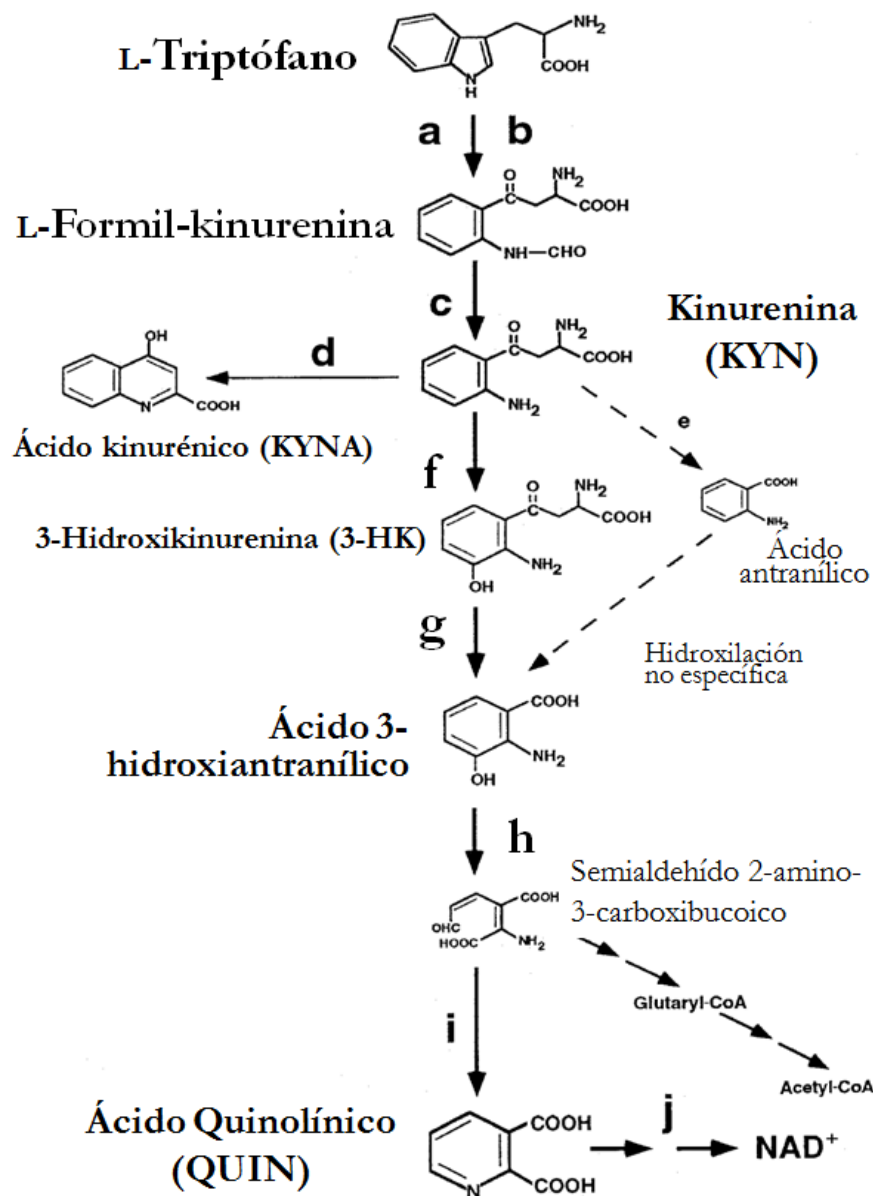
#### 3.3.1.1.1 Hipótesis kinurinérgica

En los mamíferos el triptófano es metabolizado por diferentes rutas. La más conocida es la serotoninérgica; la menos conocida, pero también la principal alternativa, es la vía de las KYN, cuyos productos finales son el ácido nicotínico y sus dos principales coenzimas:  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}$  (Heyes *et al.* 1992; Sas *et al.* 2007). Esta ruta comprende dos productos neuroactivos adicionales: la 3-hidroxicinurenina (3-HK) y el KYNA (Guidetti *et al.*, 2006). La maquinaria enzimática para su catabolismo existe tanto en el cerebro como en la periferia, teniendo una mayor presencia en este último sitio (Sas *et al.* 2007). En el SNC la vía de las KYN ocurre principalmente en las células de la glía y reduce al triptófano en un sinnúmero de metabolitos (fig. 11) (Pérez-De La Cruz & Santamaría 2007).

El consumo de KYN ocurre rápidamente en astrocitos y células de la microglía; en cambio, el KYNA no puede ser removido del espacio extracelular porque no hay proceso catabólico o de reabsorción capaz de hacerlo. De manera similar, no existe ningún mecanismo para remover a QUIN del medio extracelular, quizá ésta sea una de las razones por las cuales es tan altamente tóxico; cualquier cambio mínimo en los niveles de esta molécula es potencialmente peligroso (Sas *et al.*, 2007).

Aparte de ser una ruta normal de la red metabólica, la vía de las KYN participa en muchos eventos tóxicos que se relacionan con diferentes enfermedades neurodegenerativas (Pérez-De La Cruz & Santamaría 2007), lo que la ha convertido en una importante fuente de estudio para el desarrollo de un sinnúmero de fármacos. Al ocurrir con una frecuencia mayor a la normal, puede producir elevaciones en la concentración de KYNA y QUIN (Stone 2001). La actividad neurobiológica del QUIN podría por tanto, estar ejerciendo mecanismos subyacentes en la mayoría de las afecciones del sistema nervioso (Stone 2001). Se han detectado niveles más altos de QUIN en el fluido cerebroespinal así como en el cerebro de pacientes con algunas patologías neurológicas, como son la encefalopatía demencial por SIDA, infecciones en el sistema nervioso, encefalomielitis alérgica, trauma espinal, epilepsia, Parkinson, demencia senil, EH e isquemia y procesos normales como el envejecimiento. Las

concentraciones fisiológicas en cerebro humano, de ratas y ratones fluctúan entre los 0.03 y los 0.1  $\mu\text{M}$ , mientras que en enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias, éstas aumentan en un rango que va de las 10-246 veces más altas (10-40  $\mu\text{M}$ ) (Stone 2001; Sas *et al.* 2007; Schuck *et al.* 2007).



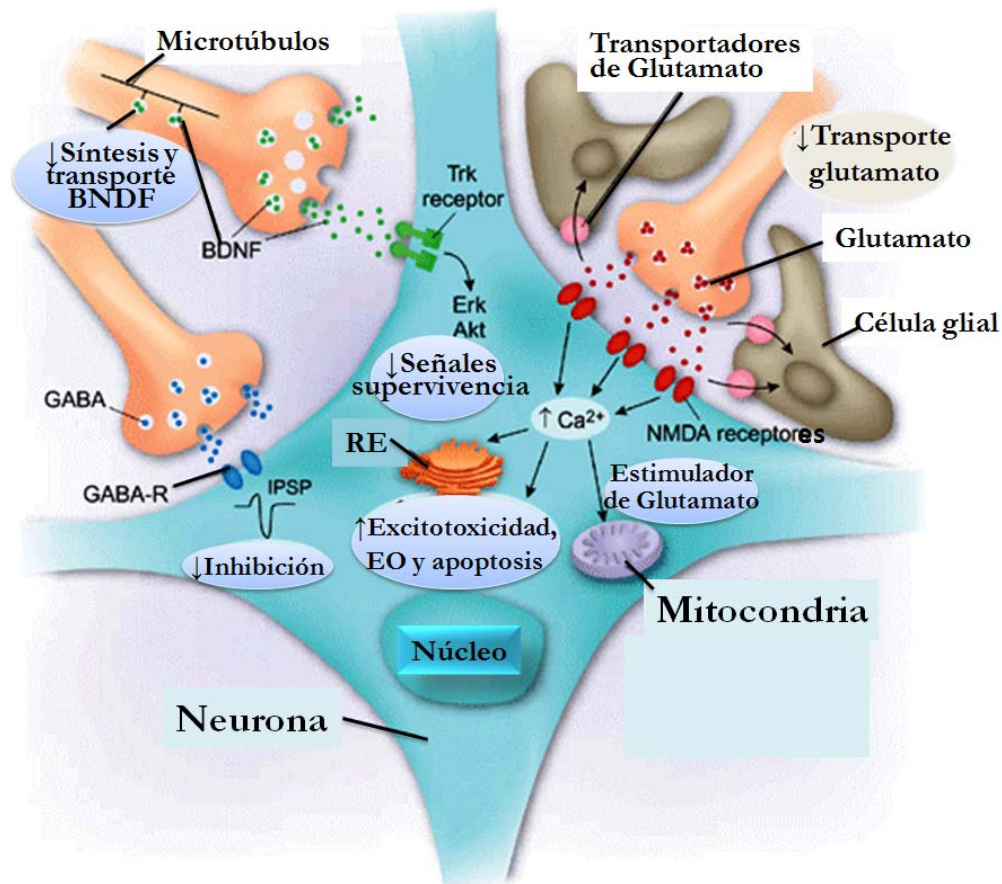
**Figura 11. Enzimas y metabolitos involucrados en la vía de las kinureninas.** (a) Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), (b) triptófano 2,3-dioxigenasa (catalizan la misma reacción pero ésta sólo presente en hígado), (c) formamidasa, (d) KYN-aminotransferasas (KATs), (e) kinureninasa, (f) KYN-3-hidroxilasa, (g) kinureninasa, (h) ácido 3-hidroxiantranílico oxigenasa, (i) arreglo no enzimático, (j) fosforribosa transferasa. Otro de los productos finales de la vía es la nicotinamida. *Imagen modificada (Heyes et al. 1997).*

La naturaleza endógena del QUIN sugiere que puede ser un agente potencialmente involucrado en la patogénesis de la EH. Es responsable de la formación desproporcionada de ERO en el estriado y la corteza de pacientes con el padecimiento junto con otro metabolito kinurinérgico: la 3-HK (Pérez-De La Cruz & Santamaría 2007). Se ha propuesto que QUIN, KYNA y 3-HK modulan la muerte neuronal excitotóxica en la EH. 3-HK induce la muerte neuronal “tipo-EH” en cultivos de neuronas estriatales y potencia la excitotoxicidad del QUIN en condiciones *in vivo* e *in vitro*; mientras que KYNA es altamente efectivo en la prevención del daño ocasionado por QUIN y 3-HK (Guidetti *et al.* 2004). El hecho de que el daño excitotóxico pueda ser disparado por concentraciones de QUIN dentro del rango fisiológico, sugiere que el QUIN endógeno podría tener un papel relevante en la neurodegeneración de la EH (Guidetti *et al.* 2006).

La hipótesis kinurinérgica, propuesta en 1980 por Schwarcz y colaboradores, propone que el exagerado incremento en las concentraciones de diferentes compuestos de la vía de las KYN, así como alteraciones en las reacciones que la conforman, podrían ser los agentes causales de la EH. Esto cobra fuerza con diversas observaciones que delatan semejanzas entre la neuroquímica e histopatología de la enfermedad y los efectos producidos por la inyección intraestriatal de QUIN. Específicamente al desbalance entre 3-HK/QUIN (usualmente un incremento) y el despunte del KYNA en la cascada de reacciones. Tales procesos juegan un papel crítico en las primeras etapas de neurodegeneración en la EH. No obstante, la medición de los niveles de QUIN en etapas tardías de la enfermedad no apoyan esta idea (Guidetti *et al.* 2004; Sas *et al.* 2007).

#### 3.3.1.1.1.2 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es uno de los principales mecanismos que lleva a la muerte celular en muchas neuropatologías y juega un papel muy importante en la neurodegeneración de la EH (Wüllner *et al.* 1994). Este término se refiere a los efectos deletéreos relacionados con altas concentraciones de Glu, a la exagerada interacción de éste con sus receptores, a la despolarización sostenida, a la consecuente entrada masiva de  $Ca^{2+}$  a la célula (fig. 12). Los rNMDA están ampliamente distribuidos y cuentan con un canal complejo permeable a este ión, el cual dispara rutas letales que involucran enzimas proteolíticas. También incrementa los niveles de ERO y ERN, potencia la liberación de más Glu y propaga el daño celular induciendo finalmente a la muerte (Pawley *et al.* 1996; Pérez *et al.* 1996; Brouillet *et al.* 1999; Boeck *et al.* 2004; Sapko *et al.* 2006; Pérez-De La Cruz & Santamaría 2007).



**Figura 12. Respuestas celulares ante la excitotoxicidad.** A la derecha se aprecia que un exceso de Glu provocado por una disminución en los transportadores gliales de Glu, conduce a la sobreestimulación de los rNMDA y, consecuentemente, a un exagerado influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia las neuronas. Este ión actúa negativamente sobre organelos como la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE), aumentando el EO y apoptótico. A la izquierda se representa cómo la pérdida de estímulos tróficos (como el del factor neurotrófico derivado de cerebro, BDNF por sus siglas en inglés) o inhibidores (baja actividad de los receptores de GABA) hacen a las células más susceptibles a la excitotoxicidad *Imagen modificada (Ross & Cleveland, 2006).*

En la citología de las neuronas, este fenómeno implica un hinchamiento del soma dependiente de los niveles extracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , seguido de un incremento masivo de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales sensibles a voltaje, o bien, por medio de rNMDA; la neurotoxicidad será mayor si ocurre vía estos últimos. En la fase final, se produce la activación de varias rutas bioquímicas, en las cuales las fosfolipasas, proteasas, cinasas y enzimas moduladas por calmodulinas, juegan un papel determinante. La entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria resulta en un bloqueo de la cadena respiratoria. De hecho, una disminución en los niveles de ATP afecta el intercambio catiónico a través de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , provocando una despolarización parcial de la membrana citoplasmática que puede activar los receptores NMDA y los canales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , elevando a su vez la

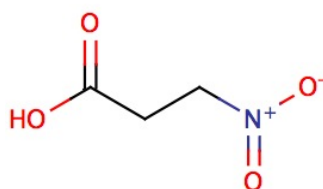


concentración celular del mismo. Todos estos eventos llevan al incremento en la producción de radicales libres y demás especies derivadas del oxígeno, que pueden llegar a producir cambios irreversibles en la composición de los lípidos y alteración en las funciones de las proteínas y ácidos nucleicos (Brouillet *et al.* 1999). El flujo catiónico a través de los rNMDA, especialmente el de  $\text{Ca}^{2+}$ , es un evento clave para que se desencadene la excitotoxicidad (Greene *et al.* 1998). Generalmente, cuando la excitotoxicidad provoca la muerte es a través de un proceso necrótico (Brouillet *et al.* 1999), pues se presenta un hinchamiento celular y una fragmentación caótica del DNA, aunque también es capaz de provocar apoptosis (Browne & Beal 2004).

Un posible mecanismo a través del cual la excitotoxicidad ocurre en la EH puede ser la interrupción progresiva del metabolismo energético, que puede llevar a la muerte neuronal por excitotoxicidad secundaria. La síntesis incompleta de ATP puede causar la despolarización parcial de la membrana neuronal con la subsecuente liberación voltaje-dependiente del ión de  $\text{Mg}^{2+}$  que se encuentra bloqueando los canales de los receptores NMDA (Wüllner *et al.* 1994).

### 3.3.1.1.2 Modelo del Ácido 3-Nitropropiónico

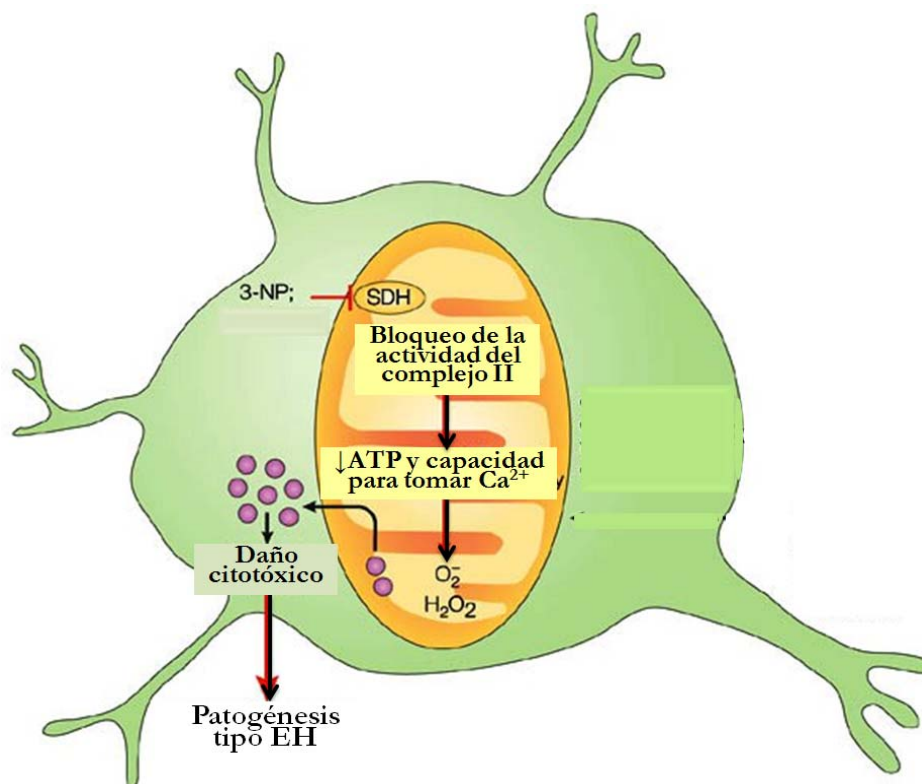
El 3-NP, por su parte, es un metabolito del nitropropanol (fig. 13). En la naturaleza se encuentra como una toxina fúngica propia de hongos del género *Arthrimum*, también en algunas plantas leguminosas como *Indigofera* o *Astragalus*; que tras ser ingeridas por animales o humanos se evidencia intoxicación y decaimiento en las funciones motoras (Brouillet *et al.* 1999).



**Figura 13.** Estructura química del 3-NP *Imagen tomada de [http://www.scbt.com]*

Interrumpe la cadena de transporte de electrones en la mitocondria a través de la inhibición del complejo II, la SDH, lo que provoca déficit energético y eventos neurodegenerativos en mamíferos, sumados a descompensaciones en otras funciones y procesos celulares, como la síntesis de proteínas y la restauración de los gradientes iónicos (fig. 14) (Ludolph *et al.* 1991; Wüllner *et al.* 1994; Fink *et al.* 1996; Alexi *et al.* 1998; Herrera-Mundo *et al.* 2006). El complejo II juega un papel importante en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (oxidando el succinato a fumarato) y es un punto de entrada de electrones en la cadena respiratoria a nivel del ubiquinol. Este bloqueo puede ocurrir por la similitud estructural e isoeléctrica que el succinato guarda con el 3-NP. Se ha propuesto

que el 3-NP se oxida a 3-nitroacrilato, una molécula inestable que luego reacciona con algunos residuos en el sitio activo. Hay una cisteína en el sitio activo que se une a otro inhibidor: el oxalacetato, posible residuo involucrado (Huang *et al.* 2005). Por este mecanismo el 3-NP impide que se complete el ciclo de Krebs y el flujo de electrones en la cadena respiratoria (Beal *et al.* 1993).



**Figura 14. Esquemmatización de los efectos nocivos del 3-NP.** Esta toxina actúa uniéndose de manera irreversible al complejo de la succinato deshidrogenasa (SDH), provocando una interrupción del metabolismo energético y otras alteraciones similares a las que ocurren durante la enfermedad de Huntington (EH). *Imagen modificada (Beal & Ferrante 2004).*

La ingesta accidental de 3-NP produce degeneración asociada con los núcleos del caudado-putamen, con severos síntomas neurológicos en humanos; por eso es que asemeja tan bien la EH (Brouillet *et al.* 2005). Se cree que esta selectividad puede deberse a la alta tasa metabólica de esta región y a los altos contenidos de rNMDA (Borlongan *et al.* 1997). Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual esta toxina actúa, la administración sistémica produce lesiones estriatales selectivas, involucradas en eventos de excitotoxicidad secundaria a través de receptores ionotrópicos de Glu, los cuales pueden desencadenar mecanismos de muerte neuronal por necrosis mayoritariamente o por apoptosis, en menor grado, que involucran a las calpainas como efector central. Además, la toxina provoca una disminución en los niveles de GSH, altera su actividad e incrementa los niveles de ERO y ERN (Herrera-Mundo *et al.*



2006); se disparan importantes eventos de EO (Kim & Chan 2002); reduce el número de neuronas GABAérgicas del estriado, de sustancia P, somatostatina, neuropéptido Y, así como neuronas dopaminérgicas (Borlongan *et al.* 1997). Es importante mencionar que también es capaz de inhibir la fumarasa, la isocitrato liasa y la acetilcolinesterasa (Fink *et al.* 1996).

En tratamientos crónicos el 3-NP provoca la relocalización del citocromo c del interior de la mitocondria hacia el citoplasma, probablemente asociada con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Tales tratamientos replican los defectos mitocondriales que se presentan en el transcurso de la EH. El bloqueo en la producción de ATP puede producir alteraciones en las ATPasas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , lo que lleva a la reducción del potencial de membrana, que a su vez, ocasiona la liberación voltaje-dependiente del ión de  $\text{Mg}^{2+}$  que se encuentra obstruyendo los canales de los receptores NMDA y, por consiguiente, se induce la sobreactivación de los mismos por medio del Glu así como a un influjo anormal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otra parte, se ha observado que neuronas estriatales primarias tratadas con 3-NP inducen la liberación citosólica de factores mitocondriales apoptogénicos, que son relocalizados en la membrana mitocondrial gracias a miembros de la familia pro-apoptótica Bcl-2 (Brouillet *et al.* 2005); adicionalmente, lleva a la activación secundaria de enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes como la fosfolipasa  $A_2$  y la NOS, también provoca una excesiva liberación de dopamina, la cual puede generar  $\text{H}_2\text{O}_2$  al ser metabolizada (Shih *et al.* 2005).

Otro cambio importante es la producción anormal de ERO, lo que lleva al daño de organelos y compuestos presentes en las neuronas. También provoca la activación de proteasas ejecutoras que inducen la muerte celular; por ejemplo, es capaz de disparar la activación de la caspasa-3. Bajo tratamientos crónicos y agudos con 3-NP también ocurre la activación de calpainas, un factor que induce la degeneración estriatal (Brouillet *et al.* 2005). La administración de 3-NP a animales se reconoce como un buen modelo para la EH porque las consecuencias conductuales en presencia de la neurotoxina son homólogas a las del padecimiento real, también porque provoca que se presenten las mismas características anatómicas, histológicas y neuroquímicas de la patología (Koutouzis *et al.* 1994). A pesar de que en ratas no se replica el componente discinético de la enfermedad, se producen alteraciones cuantificables en anomalías en el andar de los animales y algunas distonias, características también asociadas al progreso de la enfermedad (Guyot *et al.* 1997).

Se distingue al 3-NP suministrado en animales como un modelo de déficit energético, pero además induce excitotoxicidad y EO, resultando en un daño que se aumenta debido a la reducción de los niveles de ATP (Smith *et al.* 2008). En modelos *in vivo*, la neurotoxina produce anomalías en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando en un incremento citosólico del mismo (Brouillet *et al.* 2005). La

administración sistémica de 3-NP produce la selectiva degeneración estriatal, comenzando por la parte dorsolateral de la estructura y difundiéndose hacia la región ventral; el tipo de degeneración que se aprecia está mayoritariamente vinculado con la apoptosis (García *et al.* 2002). A diferencia del QUIN, este agente tóxico sí es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. A pesar de que la toxina es manejada como un buen modelo para EH, su uso es controversial, puesto que la infusión sistémica, pero no la que se hace directamente en el estriado, es capaz de reproducir en ratas las características histopatológicas idénticas a EH, pero se discute que la duración y las dosis, más que la vía de administración, son las responsables de que éstas sean evocadas (Guyot *et al.* 1997). Algunos trabajos demuestran que sólo su administración crónica y sistémica produce disfunciones motoras y estriatales comparables con muchas de las características de la EH (Brouillet *et al.* 1999). No obstante, la infusión por cualquier vía induce diferentes de lesiones (Borlongan *et al.* 1997).

#### 3.3.1.1.1.2.1 Déficit Energético

Durante mucho tiempo la hipótesis dominante de la degeneración estriatal en la EH estuvo basada en la excitotoxicidad. No obstante, el desarrollo del modelo del 3-NP permitió incluir la posibilidad de que el déficit energético también pudiera estar involucrado (Hickey & Morton 2000).

Una interrupción en el funcionamiento mitocondrial o una falla en el suplemento de oxígeno producen un daño rápido y severo. Alteraciones en las funciones de la cadena respiratoria y el daño a la misma por radicales libres acarrea una reducción de los niveles de ATP, lo que lleva rápidamente a un aumento en los niveles citosólicos de  $Ca^{2+}$  (Halliwell 2006; Hart & Schapira 1999). La disminución en la concentración de ATP provoca un incremento en la estimulación glutamatérgica, generando un ciclo aberrante que provoca daño a la neurona (Koutouzis *et al.* 1994).

La deficiencia energética provocada por la toxina daña a las neuronas en parte porque aumenta la susceptibilidad de las mismas a los efectos tóxicos de los aminoácidos excitadores. Los bajos niveles de ATP disminuyen la función de las bombas de  $Na^+/K^+$ , lo que lleva a la despolarización de la célula y la activación de los receptores NMDA. El resultante influjo de  $Ca^{2+}$  producido por el Glu es también un fenómeno mediador de daño (Fink *et al.* 1996).

### 3.4 Compuestos con Actividad Antioxidante y Proenergética

La preponderancia del daño oxidante y la formación de ER en las enfermedades neurodegenerativas se han evidenciado a través de muchos procesos experimentales. Por ello, se ha promovido la búsqueda de tratamientos que prevengan, minimicen o eliminen sus efectos, entre los cuales destacan aquellos

basados en compuestos que funcionan como antioxidantes, o bien, que planteen alternativas a la célula una vez que se le ha retado con un insulto que altera su capacidad de generar energía. La lista de este tipo de compuestos es muy extensa y el grado de restablecimiento de la integridad y funcionalidad celular difiere dependiendo de qué molécula se trate y de su forma de administración.

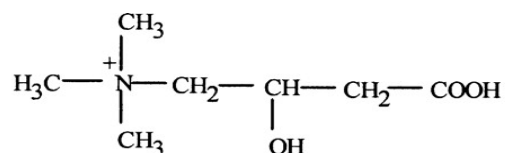
En el presente trabajo se considerarán dos diferentes compuestos, uno cuya característica principal es actuar como un mediador alternativo para el metabolismo energético, L-CAR y otro que funciona atrapando radicales libres y atenuando el daño que ocasionan, la SAC.

### 3.4.1 L-carnitina

La Levo-carnitina (ácido 4-*N*-trimetilamonio-3-hidroxi-butírico o L-CAR) es un aminoácido natural, juega un papel fisiológico importante en el metabolismo intermedio de los humanos y actúa como antioxidante y precursor energético (fig. 15). Es un derivado de dos aminoácidos esenciales: la L-lisina y la metionina. Desempeña un papel primario como mediador en el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria a través de la formación de acil-ésteres, facilitando la entrada de estos al ciclo de la  $\beta$ -oxidación y la producción de ATP (Furuno *et al.* 2001; Bueno *et al.* 2005; Gülçin 2006; Silva-Adaya *et al.* 2008). Se encarga de translocar la acetil coenzima A (acetil-CoA) hacia el citoplasma durante el transporte de la acetil-L-carnitina fuera de la mitocondria. De esta forma promueve la disponibilidad de energía para la célula y previene la acumulación tóxica de ácidos grasos de cadena larga. A pesar de que en el cerebro se da la  $\beta$ -oxidación a un nivel muy bajo, la L-CAR cruza activamente la barrera hematoencefálica y se acumula en las neuronas; se cree que en dicho sitio L-CAR desempeña una función moduladora mediando la transferencia de grupos acetilo para la síntesis de acetilcolina; además, participa en algunas señales de transducción y en la expresión de algunos genes. La neutralización de los metabolitos tóxicos de la acil-CoA reduce el decaimiento funcional de la mitocondria a través de la restauración del potencial de membrana y el consumo de oxígeno de ésta y de su actividad antioxidante (Gülçin 2006; Sima 2007; Silva-Adaya *et al.* 2008). Aún se desconoce cuáles son los mecanismos por los que L-CAR es capaz de estimular su respuesta, pero puede que esté llevando a cabo sus acciones en y alrededor de las membranas mitocondriales (Furuno *et al.* 2001). Este compuesto puede obtenerse a través de la dieta (75%) o de su biosíntesis endógena (25%) (Gülçin 2006).

Por otra parte, la L-CAR previene el EO y regula la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$ , la respiración celular y la actividad de enzimas involucradas en la defensa contra daño oxidante. Actúa como un antioxidante atrapando radicales libres o quelando el  $\text{Fe}^{2+}$  necesario para la generación de  $\text{OH}^{\bullet}$ . En presencia de 3-NP

ejerce un efecto protector en la actividad de la SDH, CAT, GPx y SOD, evitando, de esta manera, un daño peroxidante mayor (Haripriya *et al.* 2005; Gülçin 2006).

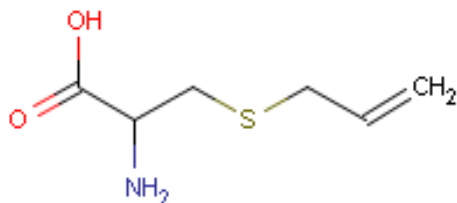


**Figura 15.** Estructura química de la L-CAR *Imagen tomada de (<http://soil.scijournals.org>).*

Entre sus efectos protectores se encuentran que suprime la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial, la apoptosis inducida por Fas y la producción de ceramidas en las células. También se ha demostrado que esta molécula es eficaz suprimiendo el hinchamiento mitocondrial y la despolarización de la membrana inducida por ácidos grasos de cadena larga (Furuno *et al.* 2001).

### 3.4.2 S-alilcisteína

El ajo (*Allium sativum*) es una de las plantas que el hombre ha venido domesticando desde épocas arcaicas. Dibujos y esculturas de éste se descubrieron en tumbas egipcias de hace 5700 años. Desde entonces ya se usaba como remedio para varias enfermedades, documentadas por los egipcios mismos en el Código Ebers hace 3550 años (Borek 2001). Esta planta ha mostrado tener efectos benéficos para el ser humano, entre los que se encuentran la actividad antimicrobiana, antitrombótica, hipolipidémica, antiartrítica, hipoglucémica y antitumoral. Numerosos estudios han demostrado que la actividad quimiopreventiva del ajo surte efecto en diferentes presentaciones como pueden ser el extracto fresco, el ajo envejecido, el aceite de ajo, y un gran número de compuestos organosulfurados derivados de éste (Thompson & Ali 2003). Algunos análisis sugieren que los compuestos organosulfurados son responsables de su actividad biológica. Estos poseen un centro de azufre reducido unido a grupos orgánicos, permitiendo la estabilización de su carga negativa (fig. 16). Esta estructura confiere fuertes propiedades antioxidantes (Ho *et al.* 2001).



**Figura 16.** Estructura química de la S-alilcisteína *Imagen tomada de (<http://www.mdidea.com>).*

El extracto de ajo fresco se deja envejecer durante un lapso prolongado (proceso mayor a los 20 meses) para producir extracto de ajo envejecido (EAE); una presentación comercial inodora del ajo contiene compuestos antioxidantes fitoquímicos que previenen el daño oxidante, incluyen varios tipos de compuestos organosulfurados hidrosolubles y liposolubles así como flavonoides. La concentración de los compuestos (mg/g de producto) es la siguiente: alin, 0.3;  $\gamma$ -glutamilcisteínas, 0.34;  $\gamma$ -glutamil-*S*-alilcisteínas, 0.25; *S*-alilcisteína, 0.6; y *S*-alilmercaptocisteína, 0.15. Los compuestos organosulfurados hidrosolubles (*S*-alilcisteína y *S*-alilmercaptocisteína) son los más estables y abundantes, su biodisponibilidad promueve el buen desempeño de su actividad antioxidante (Borek 2001; Maldonado *et al.* 2003a; Thompson & Ali 2003; Pérez-Severiano *et al.* 2004b). Entre las propiedades antioxidantes de SAC se encuentran su capacidad para atrapar  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otros radicales libres, aumentando la concentración de GSH en las células y potenciando la producción de enzimas antioxidantes como la SOD, CAT y GPx; también inhibe la PL y reduce el daño por isquemia/reperfusión. Evita la activación del NF- $\kappa$ B y regula la producción de NO $\bullet$  a través de la inhibición de la NOS; protege contra la pérdida de las funciones cerebrales durante el envejecimiento, reduciendo otras consecuencias inherentes a dicho proceso, pues incrementa las funciones cognitivas, la memoria y la longevidad (Borek 2001; Pérez-Severiano *et al.* 2004). Existe evidencia de que parte de la acción quimiopreventiva del ajo se debe a la inducción de enzimas tales como GST, quinona reductasa, epóxido hidrolasa y glucoronosil-transferasa, que inactivan las moléculas o sustancias tóxicas y facilitan su excreción (Munday & Munday 1999; Thompson & Ali 2003).

La naturaleza hidrofílica de SAC le permite reaccionar no sólo con las moléculas oxidantes embebidas en la membrana (lípidos peroxidados, por ejemplo), sino también atraparlas del medio extracelular, pues muchas ERO son hidrofílicas. Además, ejerce un efecto sinérgico reduciendo la carga oxidante reaccionando con radicales y, por otro lado, regenera los antioxidantes liposolubles (Ho *et al.* 2001).

Perchellet y colaboradores demostraron que el aceite de ajo estimula la actividad de la GPx y evita que disminuya la proporción intracelular de la glutatión en su forma oxidada (Perchellet *et al.* 1986; Thompson & Ali 2003). También se encontró que inhibe LOX, una enzima requerida en el metabolismo del ácido araquidónico, compuesto que participa en los procesos de inflamación (Belman 1985; Block *et al.* 1988; Thompson & Ali 2003).

En lo que respecta al EAE, Balasenthil y colaboradores investigaron el efecto de éste en los niveles antioxidantes en hamsters con cáncer bucal, viendo que, efectivamente, disminuía la PL; este efecto se sumaba al incremento en los niveles de GSH, GPx y glutatión S-transferasa (GST) (Balasenthil *et al.* 1999; Thompson & Ali 2003).

*La memoria no es un arma dispuesta para evocar el pasado.  
Es más bien una facultad que nos permite, en un instante,  
ver lo que es, en su esencia, fuera de tiempo.*  
**Ermilo Abreu Gómez**

#### 4. ANTECEDENTES

Existen muchos estudios que comprueban, por un lado, la similitud entre los efectos provocados por las toxinas QUIN y 3-NP en las características conductuales, morfológicas y fisiológicas que se desenvuelven en la EH y en otros procesos de daño neuronal, y por otro, las cualidades positivas de los compuestos antioxidantes SAC y L-CAR al aplicarse bajo diferentes esquemas y usarse contra el daño tóxico evocado por las toxinas ya mencionadas. A continuación se hará una reseña de los resultados más significativos al respecto.

Para QUIN y 3-NP se han evaluado variables muy dispares entre sí, periodos que van desde horas hasta años, esquemas de administración variables en modalidad y cantidad, tipo de ratas empleadas, entre otras. Los estudios pioneros con QUIN se realizaron en ratas macho Sprague-Dawley a las que se les inyectó directamente en diversas regiones del cerebro 120 nmol/ $\mu$ L de QUIN, ocurriendo en el estriado la degeneración más devastadora; las ratas que sufrieron esta manipulación, manifestaron movimientos aberrantes en las extremidades superiores, presentaron giro de barril 2-4 horas posteriores a la lesión (Schwarcz & Köhler 1983).

Bazzett y su grupo de trabajo (1996a), usando un modelo de administración crónica a través de una cánula, administraron 3.3 M de la sustancia, evaluaron conducta e histología a los 7 días post-infusión y encontraron que efectivamente el daño que se había producido era significativo. En cuanto a conducta se refiere, aumentó la hiperactividad nocturna y los exámenes histológicos arrojaron una disminución en las neuronas estriatales.

Pérez y colaboradores (1996) midieron el contenido total de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  en 5 regiones del cerebro de la rata después de 7 días de haber administrado de manera unilateral la dosis única de 240 nmol/ $\mu$ L de QUIN. La concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  en el cerebelo, hipocampo, cerebro medio y cuerpo estriado, incrementó; mientras que el  $\text{Mn}^{2+}$  sólo lo hizo en el estriado dado que este elemento induce a la neurotoxicidad por alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y se asocia con los fenómenos de excitotoxicidad provocados por la toxina (Pérez *et al.*, 1996). Más recientemente en México, el mismo grupo de trabajo ha hecho pruebas que demuestran que a tiempos cortos (2, 4 y 6 horas), así como a tiempos más largos (una semana o un mes), concentraciones de QUIN que rebasan el umbral fisiológico provocan daño neuronal (Santamaría *et al.* 2003; Pérez-Severiano *et al.*

2004b; Pérez-De la Cruz *et al.* 2005; Santamaría & Jiménez 2005; Santamaría *et al.* 2005; Silva-Adaya *et al.* 2008).

Con respecto al 3-NP, se han realizado proyectos similares. En un estudio llevado a cabo por Gould y Gustine en 1982 se obtuvo que la administración sistémica de 3-NP induce un hinchamiento de la mitocondria y una reducción sustancial de la actividad de la SDH al medirla en rebanadas de cerebro. Por otro lado, se demostró que tras la administración intraestriatal de 1000 nmol/ $\mu$ l de 3-NP, evaluando 3 horas y 7 días post-lesión a través de diferentes pruebas neuroquímicas e histológicas, los marcadores para neuronas de proyección espinal e interneuronas se veían igualmente afectados, presentando un mayor grado de afección aquellas pertenecientes a los 7 días (Beal *et al.* 1993).

Brouillet y colaboradores en 1993, trabajaron con ratas de diferentes edades (1, 2-3 y 4-5 meses) que recibieron la inyección única de 500 nmol de 3-NP en el estriado derecho. Tres horas después de haber recibido el tratamiento, se detectaron incrementos en los niveles de lactato en los sitios de inyección. Además de esta respuesta, en ratas de 1 y 4 meses se reveló una disminución significativa en los niveles de ATP. Los defectos neuroquímicos de la lesión intraestriatal consistieron en una reducción significativa de los niveles de GABA, sustancia P (SP), somatostatina (S), neuropéptido Y (NPY), dopamina y sus metabolitos en los grupos de animales de 4 y 12 meses de edad, mientras que en los de un mes no se percibieron dichos cambios. La gravedad de las lesiones estriatales varió de manera directamente proporcional a lo avanzado de la edad; es decir, mientras más envejecida esté una neurona, más probabilidad tiene de que se desencadene un proceso de muerte (Brouillet *et al.* 1993).

Existe controversia en definir cuál de los dos modelos es el que mejor representa las consecuencias de la EH. Hay grupos que sostienen que el QUIN es el mejor, basando este supuesto en la “hipótesis kinurinérgica”, que plantea que este compuesto es producido de manera importante durante las primeras etapas de la enfermedad, así como en el hecho de que se trata de un metabolito endógeno (Pérez-De La Cruz & Santamaría 2007). En cambio, Borlongan *et al.* (1997), afirman que dadas las similitudes histoquímicas y patológicas, así como conductuales que se presentan de manera crónica durante la EH, es el 3-NP el que mejor reproduce dicho mecanismo de acción, ya que los procesos graduales a través de los cuales induce la atrofia de neuronas estriatales son más fieles con este agente que con el modelo excitotóxico. A pesar de la disyuntiva anterior, más que tratar de identificar cuál es el mejor modelo, lo conveniente es asumir que ambos se complementan, ya que a pesar de que su modo de acción es muy similar, cada uno, por su parte, simula diferentes procesos que se dan durante el desarrollo de la patología.

Para prevenir los daños causados por las QUIN y 3-NP, se han hecho estudios que demuestran que el uso de algunos compuestos con actividad

antioxidante son eficaces al ser usados como pretratamiento a la lesión intraestriatal de uno o ambos y la intraperitoneal (*i.p.*) de 3-NP (Santamaría *et al.* 2003; Pérez-Severiano *et al.* 2004b; Pérez-De la Cruz *et al.* 2005; Santamaría & Jiménez 2005; Santamaría *et al.* 2005; Silva-Adaya *et al.* 2008).

Un estudio realizado por Pérez-Severiano y colaboradores en el 2004(b), probó que la SAC (150, 300 ó 450 mg/kg *i.p.*) tenía funciones antioxidantes efectivas al ser empleada como un pretratamiento al insulto tóxico *in vivo* con QUIN, demostrando que la concentración más efectiva es la de 300 mg/kg, pues reduce la formación de ERO en el estriado lesionado y la PL. También previno un decaimiento de la actividad de la Cu/Zn-SOD, disminuyó la conducta rotacional y las alteraciones morfológicas en el caudado-putamen.

En el 2004 Maldonado y su equipo publicaron un trabajo en el que se midieron los efectos de la administración sistémica de SAC (300 mg/kg *i.p.*) ante diferentes marcadores de la toxicidad *in vivo* evocada 30 minutos después por la inyección intrahipocampal del fragmento A $\beta$ (25-35) (100  $\mu$ M), modelo fenotípico de la enfermedad de Alzheimer, demostrando su efectividad al reducir la formación de ERO y la PL (Pérez-Severiano *et al.* 2004c).

En el 2006, Herrera-Mundo y colaboradores probaron los efectos de SAC (300 mg/kg *i.p.*) administrado a ratas 30 minutos antes de tratarlas con la neurotoxina 3-NP (30 mg/kg *i.p.*). Se determinó que SAC era capaz de prevenir alteraciones conductuales en los roedores, así como de preservar la actividad de la Mn-SOD y también disminuir los niveles de PL y la caída de la actividad mitocondrial (Herrera-Mundo *et al.* 2006). Ese mismo año y basándose en el mismo modelo (3-NP), Pérez-De la Cruz evaluó los efectos de SAC en fracciones sinaptosomales de todo el cerebro que fueron expuestas tanto a la toxina como a SAC. Las concentraciones de 3-NP variaron de 0.75-2.56 mM, observando que los niveles de PL se veían potenciados; mientras que los valores de SAC oscilaron entre los 0.1-2 mM. El compuesto redujo la PL de manera dosis dependiente; además, inhibió la disfunción mitocondrial (Pérez-De la Cruz *et al.* 2006).

Un trabajo publicado por Haripriya (2005) comparó los efectos de la administración *i.p.* de L-CAR (300 mg/kg) en ratas Wistar contra la acumulación del daño oxidante al DNA asociado con la edad en distintas regiones del cerebro. Obtuvo como resultado una mejora en las concentraciones de DNA intacto posterior a la administración de L-CAR. Esto se debió a la capacidad de L-CAR para promover la síntesis de ATP, el cual ayuda al cerebro a fosforilar proteínas en la síntesis y procesamiento de ácidos nucleicos; además de mediar mecanismos de reparación, se cree que puede prevenir el daño a esta biomolécula. Por otra parte, se encontró que L-CAR potencia la renaturalización del DNA acelerando la actividad de la enzima poli (ADP ribosil) polimerasa. También se observó que la edad promueve un incremento de las concentraciones de 8-OHdG en el cerebro



completo debido quizá a ineficiencias en el sistema antioxidante endógeno, el cual es incapaz de prevenir completamente el daño al DNA, pero ante L-CAR se previno la acumulación de 8-OHdG. También se presentó un incremento en los niveles de GSH, lo que mejoró la actividad de la GPx y promovió el estatus endógeno de las vitaminas E y C, mismas que tienen actividad antioxidante (Haripriya *et al.* 2005).

En 2006, Gülçin publicó un trabajo en el que se evaluaron *in vitro* los efectos de la L-CAR como un posible antioxidante. Gülçin no sólo comprobó esto, sino que vio que era capaz de prevenir la acumulación de productos finales resultado de la lipoperoxidación. Comprobó que la L-CAR y sus ésteres inhiben parcialmente en los liposomas la PL inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ , formando complejos con el  $\text{Fe}^{2+}$  libre, por tanto, la reducción en los niveles de lipoperoxidación puede deberse a la propiedad  $\text{Fe}^{2+}$ -quelante de la L-CAR. El  $\text{Fe}^{2+}$  es el agente prooxidante más poderoso e importante que promueve el daño oxidante a los lípidos a través de la reacción de Fenton. En presencia de agentes quelantes los metales son incapaces de formar complejos con otras moléculas. La estructura de la L-CAR sugiere que es capaz de quelar iones de  $\text{Fe}^{2+}$  que estén acompañados de grupos  $\text{OH}^{\bullet}$  y carboxilato. Una de las conclusiones más importantes que se obtuvieron a partir de este estudio fue que la principal acción de la L-CAR como un agente protector de la peroxidación está relacionada con su capacidad de unión al  $\text{Fe}^{2+}$  (Gülçin 2006).

Silva-Adaya y colaboradores, en un estudio del 2008, evidenciaron los efectos neuroprotectores del pretratamiento con L-CAR (100 mg/kg *i.p.*) en condiciones *in vivo* e *in vitro* sobre un modelo de daño oxidante por QUIN (240 nmol/ $\mu\text{L}$ ), uno de déficit energético inducido por 3-NP (7.5 mg/kg *i.p.*) y uno sinérgico, por ambas toxinas. La L-CAR resultó ser eficiente previniendo la conducta de rotación en el caso del QUIN y los patrones hipocinéticos en el caso del 3-NP, previniendo las asimetrías motoras inducidas por el modelo sinérgico. Las alteraciones morfológicas también se redujeron y se previno la disminución de los niveles de GABA en el caso del modelo sinérgico.

El laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN “MVS”) se distingue por hacer investigación relacionada con los daños provocados por el EO en el sistema nervioso en modelos generales y específicos de enfermedades neurodegenerativas. Es ahí donde se han determinado muchas de las características que tienen los compuestos propuestos en este protocolo, no sólo aquellos que inducen al daño, sino también los que tienen alguna acción protectora, pero la investigación al respecto sólo se ha enfocado en ellos cuando son usados como pretratamiento a la lesión que simula los síntomas del orden planteado.

*No hay un hecho, por humilde que sea,  
que no implique la historia universal y su  
infinita concatenación de efectos y causas.  
Jorge Luis Borges*

## 5. JUSTIFICACIÓN

Dado que en la mayoría de los modelos experimentales de la EH se han probado varios fármacos con mecanismos diferentes que han mostrado proteger o atenuar el daño tóxico inducido a las células nerviosas, es de importancia en investigación, tanto básica como clínica, saber si los efectos negativos provocados por el QUIN y el 3-NP pueden ser frenados o revertidos al usar L-CAR y SAC como postratamientos; es decir, determinar si son capaces no sólo de evitar, sino también de remediar o restituir las alteraciones en las neuronas.

Se pretende conocer el efecto al corto y mediano plazo: 4 horas y 7 días, respectivamente, pues son esos los tiempos en los que se ha reportado que el daño por los agentes tóxicos se ha producido y en los cuales se ha demostrado que existe protección al emplear alguna sustancia como pre-tratamiento.

De esta manera se busca proveer información clave que resulte en la planeación potencial de fármacos contra la EH y otras alteraciones neurodegenerativas, donde el EO tenga un papel preponderante.

*Especulo si los momentos decisivos lo son desde  
el instante en que acontecen , o si por el contrario,  
sólo se vuelven decisivos a la luz de lo que ocurre  
después de ellos o a raíz de ellos.*

*Laura Restrepo*

## **6. HIPÓTESIS**

Debido a la confirmada acción protectora de los compuestos Levo-carnitina (L-CAR) y S-alilcisteína (SAC) funcionando como antioxidantes y/o precursores energéticos al ser empleados como tratamientos preventivos en dos modelos fenotípicos de la EH, se espera sean efectivos al usarse como postratamientos a tiempos cortos y subcrónicos después de la infusión única de las toxinas QUIN o 3-NP en el estriado, evitando así que continúe el deterioro de la estructura y función de las neuronas, específicamente en cuanto a integridad membranal y actividad mitocondrial se refiere.

*Soy un ser normal que quiere asirse a algo.  
No me importa que después venga el desencanto y la muerte,  
sólo pretendo un consuelo temporario.  
Mario Benedetti*

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo general**

Caracterizar los efectos de la L-carnitina y S-alilcisteína sobre las acciones inducidas por 3-NP o QUIN a las 4 horas y a los 7 días, en el estriado de ratas.

### **7.2 Objetivos particulares**

- i. Analizar cualitativamente el grado de daño en las funciones estriatales de la rata a través de la conducta de rotación.
- ii. Evaluar la actividad de los antioxidantes empleados en términos del mantenimiento, mejora o decaimiento de la funcionalidad mitocondrial en fracciones sinaptosomales, concretamente, de la capacidad reductora de este organelo.
- iii. Determinar si los compuestos utilizados pueden recuperar o incrementar la integridad, o bien, disminuir el deterioro provocado a los lípidos de la membrana resultado de la acción de alguna de las neurotoxinas.

*La percepción, sin comprobación ni fundamento,  
no es garantía suficiente de verdad.  
Bertrand Russell*

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos desarrollados en el presente trabajo están basados en modelos *in vivo*; es decir, los procesos descritos ocurrieron dentro de organismos vivos, ya que son más apropiados para dar seguimiento y observar los efectos finales, haciéndolos más comparables con aquellos que se puedan presentar en la realidad dado que el fenómeno que se está estudiando interactúa con todas las variables producto de las funciones que tienen lugar en un organismo. No obstante, los parámetros descritos se realizaron *ex vivo*, o sea, usando el tejido vivo extraído de los animales pero trabajándolo fuera del mismo, sin alterar abruptamente las condiciones naturales en las que éste se encontraba.

### 8.1 Animales y Reactivos

A lo largo de todo el estudio fueron usadas 128 ratas Wistar macho de entre 280-320 g reproducidas en el “Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio”. En todos los procesos experimentales, los animales se mantuvieron en cajas acrílicas en grupos de cinco y fueron provistos con alimento balanceado por estándares comerciales (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc., Richmons, IN, USA) y agua *ad libitum*. La habitación en la que se mantuvieron permaneció en condiciones constantes de temperatura ( $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $50\pm 10\%$ ) y luminosidad (ciclos alternados luz/oscuridad de 12 h). Todos los animales fueron manejados de acuerdo con la *Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* y las guías locales de uso ético de animales del Ministerio de Salud de México. Durante todos los experimentos se hizo el mayor esfuerzo por minimizar el sufrimiento de los animales y el número de ejemplares usados. Es importante mencionar que para la formación de grupos y procesos, los animales fueron seleccionados aleatoriamente para evitar sesgos.

Las principales sustancias empleadas en este trabajo fueron QUIN, 3-NP, MDA, ácido tiobarbitúrico (TBA), bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTI) y apomorfina (APM), que fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La *S*-Alilcisteína fue sintetizada en el INNN “MVS” por el laboratorio de la Dra. Ma. Elena Chánez con base en el procedimiento descrito en Maldonado *et al.* 2003. *S*-alilcisteína estándar (SAC-St) fue provista por Wakunaga of America Co., Ltd (Mission Viejo, CA, USA). Fue sintetizada

por la reacción de L-cisteína con alil bromiduro y purificado por recristalización en presencia de etanol-agua; el producto final fue comparado con SAC-St por espectroscopía de resonancia magnética (Maldonado *et al.*, 2003b). L-CAR se obtuvo de Sigma-Tau (Pomezia, Rome, Italy). Todas las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada obtenida directamente del sistema Direct-Q UV 3 (Millipore, MA, USA).

## 8.2 Esquema de administración de las drogas

Se trabajó con dos modelos tóxicos; en ambos casos se hizo una infusión única de 1  $\mu$ L directamente en el estriado del hemisferio derecho de la rata valiéndose de una jeringa Hamilton (Waldner *et al.* 2001), pero los protocolos fueron desarrollados por separado:

(i) El primero consistió en la lesión con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) (Santamaría *et al.* 2003; Pérez-Severiano *et al.* 2004b; Pérez-De La Cruz *et al.* 2005; Santamaría & Jiménez 2005; Santamaría *et al.* 2005; Silva-Adaya *et al.* 2008), haciendo uso del aparato estereotáxico, empleando las coordenadas indicadas por Paxinos y Watson (1998): +0.5 anterior a bregma; -2.6 lateral a bregma; -4.5 ventral a la dura.

(ii) El segundo modelo se hizo con 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L) (Brouillet *et al.* 1993; Borlongan *et al.* 1997; Ikonomidou *et al.* 2000; Schocke *et al.* 2000), usando las coordenadas mencionadas con anterioridad.

En ambos casos se sometió a análisis la actividad de los antioxidantes en cuestión como postratamientos a la infusión de las toxinas. Los dos compuestos fueron administrados *i.p.* en distintas concentraciones: SAC, 300 mg/kg, y L-CAR, 100 mg/kg. El tratamiento fue dado a las ratas 120 minutos después de que recibieron el insulto tóxico o diario durante 7 días, dependiendo de los propósitos experimentales. Al grupo control se le administró solución salina.

Los diseños se dividieron entonces en dos partes dependiendo de los propósitos experimentales: tratamiento agudo (tiempos cortos) y tratamiento subcrónico (tiempos medianos). Se hizo de esta manera para observar la respuesta de las sustancias antioxidantes a través del tiempo y hacer una mejor caracterización de su respuesta como postratamiento. En el primer caso, la disolución fue recibida 2 horas después de haber causado la lesión y las pruebas bioquímicas se hicieron 2 horas más tarde (4 horas después de ocurrido el insulto tóxico). En el segundo caso, el tratamiento comenzó a recibirse 2 horas después de haber hecho la operación estereotáxica y se prolongó durante 7 días, tratando a los animales cada 24 horas; 2 horas después de la última administración se midieron los parámetros deseados.

Independiente al esquema de tratamiento se formaron grupos de 6 ratas cada uno: Grupo I (Control), Grupo II (QUIN ó 3-NP), que recibió el vehículo

(solución salina *i.p.*); mientras que el grupo III (QUIN ó 3-NP + antioxidante), recibió L-CAR (100 mg/kg) ó SAC (300 mg/kg), según fuera el caso. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg, *i.p.*), 15 minutos más tarde se procedió a la lesión unilateral intraestriatal con alguna de las toxinas o bien, solución salina para el control. Después se trataron bajo los esquemas ya planteados.

### 8.3 Medición de la Conducta

Se evaluó la conducta rotacional 7 días después del suministro de QUIN o 3-NP. Cada grupo de animales fue administrado con APM (1mg/kg) y 5 minutos después se registró, durante 60 minutos, el número de giros de 360° que realizaron. (Silva-Adaya, *et al.*, 2008). Concluida la evaluación, los roedores fueron sacrificados por decapitación y el tejido estriatal fue conservado en HEPES a -70°C para la aplicación de pruebas bioquímicas.

### 8.4 Pruebas bioquímicas

Según el esquema que se estuviera trabajando, las pruebas bioquímicas se realizaron a distintos tiempos: 4 horas después de haber provocado la lesión en el estriado con la toxina o con la solución salina, independientemente del tipo de postratamiento que hubieran recibido los animales o posterior a la medición de conducta, 7 días después de recibir el insulto tóxico.

#### 8.4.1 Obtención de sinaptosomas

Para poder realizar las pruebas bioquímicas se obtuvieron fracciones sinaptosomales P2, ya que brindan una buena aproximación a lo que ocurre en los sistemas vivos en cuestiones de funcionalidad al actuar como minicélulas; además, son de fácil obtención. Los roedores fueron sacrificados por decapitación y rápidamente fue removido el cerebro. Los estriados lesionados fueron usados para análisis (Santamaría *et al.* 2003), haciendo modificaciones al procedimiento descrito por Pérez-De La Cruz *et al.* 2005:

1. Se extrajo el cerebro completo de la rata.
2. Se removió cuidadosamente el estriado.
3. Se adicionó a esa fracción del cerebro 1.3 mL de sacarosa 0.32 M y se homogeneizó.
4. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos.
5. Se obtuvo el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 12000 rpm, 15 minutos.
6. Se eliminó el sobrenadante.
7. Se agregó al pellet 1.3 mL de HEPES y se resuspendió.

8. Las muestras fueron almacenadas a  $-75^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo en las pruebas bioquímicas (Pérez-Severiano *et al.* 2004a).

#### **8.4.2 Funcionalidad mitocondrial**

La función mitocondrial se evaluó también en vesículas sinápticas P2 por el ensayo de reducción de MTT, un indicador parcial del estatus de la cadena respiratoria y la función mitocondrial. Se siguieron los pasos desarrollados por Pérez-De la Cruz *et al.*, 2005 con algunas modificaciones. A  $300\ \mu\text{L}$  de homogenado estriatal se le agregaron  $300\ \mu\text{L}$  de HEPES y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ . Concluido este tiempo, a cada muestra se le agregaron  $6\ \mu\text{L}$  de MTT ( $5\text{mg}/\text{mL}$ ), con agitación simultánea en el vortex y se incubaron durante 15 minutos más a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los tubos se centrifugaron a  $1200\ \text{rpm}$  durante 3 minutos. Se removió el medio y los cristales de formazán precipitado se resuspendieron en  $750\ \mu\text{L}$  de isopropanol ácido. Se hizo una segunda centrifugación, esta vez a  $1000\ \text{rpm}$  por 1 minuto. La cuantificación espectrofotométrica de formazán se llevó a cabo con el aparato ThermoSpectronic Genesys 8 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) con una longitud de onda de  $570\ \text{nm}$ . Los resultados se expresaron como el porcentaje de reducción por MTT con respecto a los valores obtenidos en las muestras control.

#### **8.4.3 Peroxidación de lípidos**

La medición de lípidos peroxidados se llevó a cabo por medio de la técnica de TBA, la cual se desarrolló sobre las fracciones sinaptosomales previamente aisladas, midiendo la formación de sustancias reactivas al TBA (TBARS), de acuerdo con reportes previos (Pérez-De La Cruz *et al.* 2006):

1. Se tomaron alícuotas de  $500\ \mu\text{L}$  de los sinaptosomas aislados pertenecientes a los distintos grupos experimentales.
2. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos en un baño de incubación.
3. Los tubos se sacaron y se les agregó  $500\ \mu\text{L}$  del reactivo de TBA.
4. Se colocaron en baño María ( $94^{\circ}\text{C}$ ) por 20 minutos. En las muestras, como resultado, se produjo un cromóforo rosado cuya intensidad estuvo en relación directa con la cantidad de productos peroxidados.
5. Los tubos se retiraron del agua hirviendo y fueron puestos a enfriar directamente sobre hielo durante 5 minutos, destapándolos para permitir que salieran los vapores.
6. Las muestras fueron centrifugadas a  $10500\ \text{rpm}$  por 15 minutos.
7. La densidad óptica del sobrenadante se midió haciendo uso del espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA), con una longitud de onda de  $532\ \text{nm}$ .



La cantidad final de TBARS (la mayoría de ellas, MDA), fue calculada por medio de una interpolación de valores en una curva estándar de MDA y corregida por el contenido de proteínas en cada muestra por medio de la técnica de Lowry. Los resultados se expresaron como nmol de TBARS por miligramos de proteína.

#### 8.4.5 Medición de proteínas

Se determinó con el método descrito por Lowry y colaboradores, 1951.

1. Se prepararon disoluciones de 200  $\mu$ L con el tejido homogenado 1:100
2. A todas las muestras se les añadió 1 mL de solución C (Sol C: 50 mL de Sol A + 1 mL de Sol B al momento; para preparar 1 L de Sol A se mezcló carbonato de sodio 2% (20 g), NaOH 0.4% (4 g) y tartrato de sodio 0.02% (0.2 g); Sol B: sulfato cúprico pentahidratado ( $\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$ ) 1.25 g + 250 mL agua).
3. Se agitaron en el vortex y se esperó 10 minutos a temperatura ambiente.
4. A todos los tubos se les agregó 100  $\mu$ L de reactivo de Folin al 50% con agitación simultánea.
5. Posterior a esto, se volvieron a dejar los tubos incubando 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Finalmente, se determinó la densidad óptica de las muestras usando el espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) con 550 nm.

Los resultados obtenidos fueron comparados con una curva patrón de solución de albúmina al 0.05%.

#### 8.5 Análisis estadístico

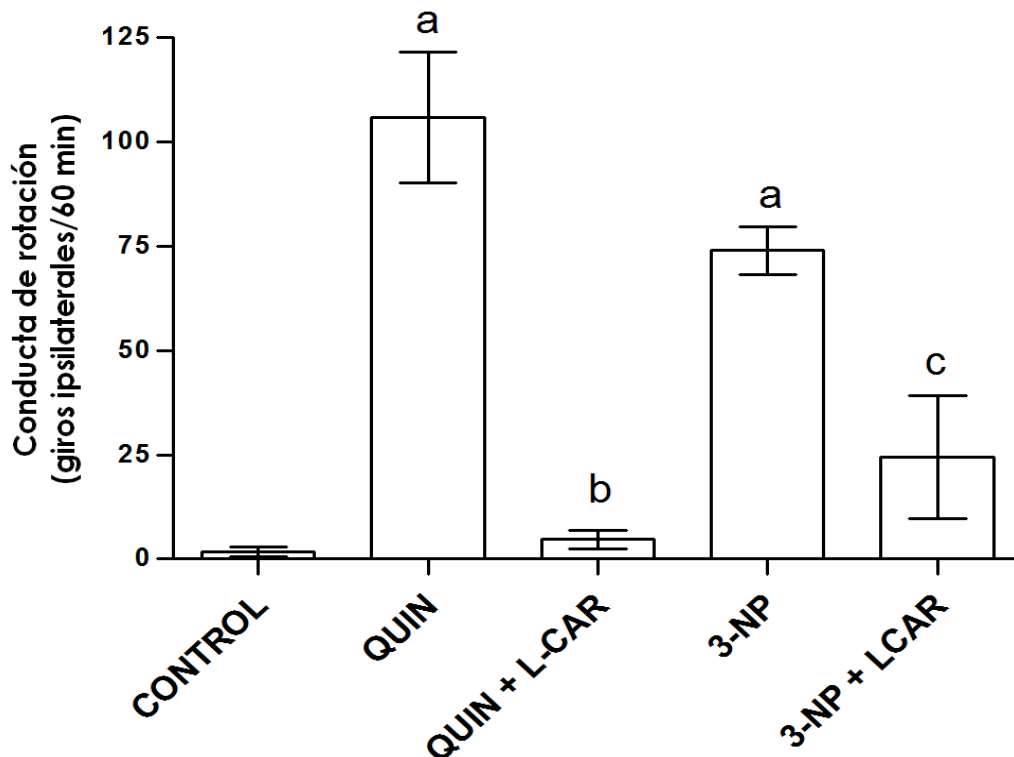
Todos los resultados fueron expresados a través de los valores de la media  $\pm$  el error estándar (EEM) de los datos obtenidos. Los resultados de conducta fueron analizados por un *ANOVA Kruskal-Wallis* y la prueba de *Mann-Whitney*. En cambio, a los parámetros bioquímicos se les aplicó *ANOVA de una vía* seguidos por un análisis de *Tukey*. El software usado fue GraphPad Prisma 5.0. Para todas las pruebas se tomaron como significativos valores cuya  $P < 0.05$ .

*Las afirmaciones que no pueden probarse,  
las aseveraciones inmunes a la refutación,  
son verdaderamente inútiles.*  
*Carl Sagan*

## 9. RESULTADOS

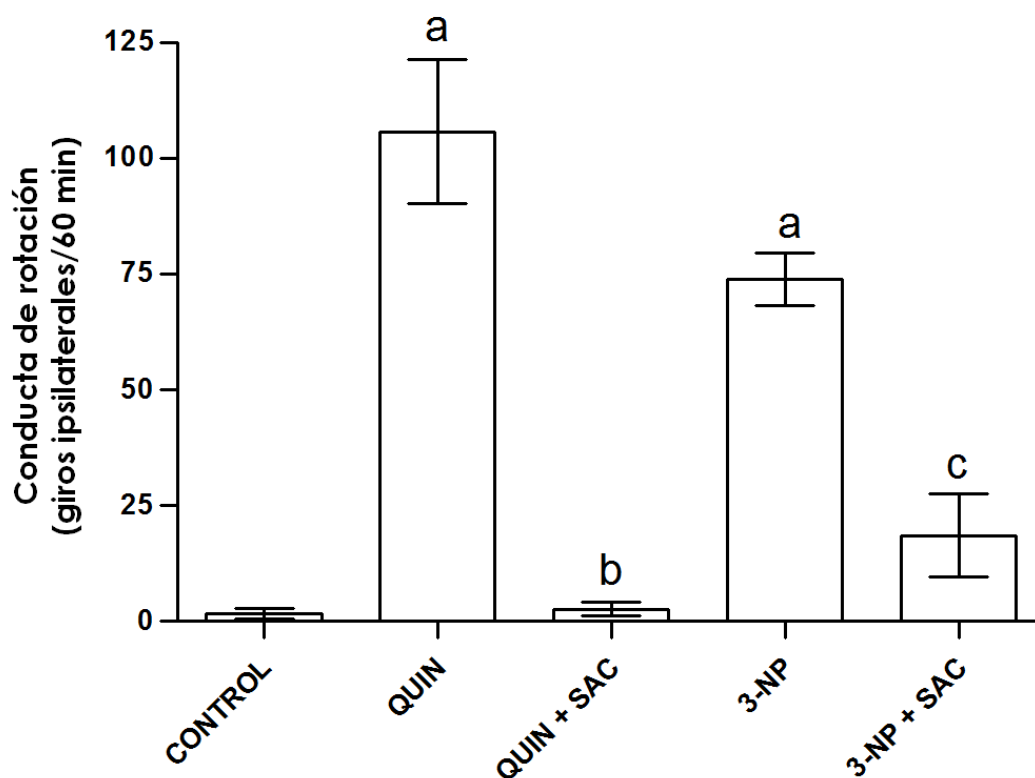
### 9.1 Conducta de rotación

La alteración de los patrones conductuales a la semana de haber recibido la infusión estriatal de las toxinas junto con el efecto que tuvieron las dosis de L-CAR en los animales, se muestran en la figura 17. En ambos casos, tanto en presencia de QUIN como de 3-NP, el número de giros *ipsilaterales* inducido por el agonista dopaminérgico suministrado minutos antes de realizar la evaluación es muy elevado, lo cual evidencia que el deterioro tisular fue severo comparado con el grupo control donde los giros fueron casi inexistentes (entre 0 y 5).



**Figura 17.** Efecto de L-CAR (100 mg/kg/día *i.p.* por 7 días) sobre las alteraciones motoras inducidas por la lesión con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L) en ratas tras el reto con apomorfina (1 mg/kg, *s.c.*). La conducta de rotación se evaluó durante 60 minutos posteriores a la administración del agonista dopaminérgico. Cada barra representa el valor medio de los giros que se presentaron en cada grupo experimental  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $P < 0.01$ , diferente del control; <sup>b</sup> $P < 0.01$ , diferente del QUIN; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , diferente de 3-NP; tras realizar las pruebas de Kruskal–Wallis y Mann–Whitney.

Después de 60 minutos el agente tóxico que provocó un mayor número de giros en las ratas fue el QUIN, alrededor de 100; mientras que con el 3-NP los giros fluctuaron alrededor de los 75. También en la figura 17, es posible apreciar que la administración de L-CAR como postratamiento disminuye drásticamente la conducta de rotación, tomando como referencia aquellos animales que recibieron solución salina. En el caso del QUIN+L-CAR los giros se redujeron entre un 90 y 95%, al punto de casi igualar al grupo que sólo recibió el vehículo. En los roedores que recibieron el antioxidante después de haber sido dañados con 3-NP también hubo una reducción sustancial en el número de giros presentados, pasando de 78 a 24. Los animales mostraron menos de la mitad de los giros en relación al grupo que recibió el inhibidor del complejo II de la cadena mitocondrial y solución salina como tratamiento: las ratas exhibieron entre 15 y 40 giros completos. No obstante, el resultado positivo de la L-CAR ante el insulto provocado por 3-NP (reducción en el número de giros al 70%) no fue tan notorio como ocurrió con el derivado del triptófano (los animales presentaron menos del 95% de los giros).



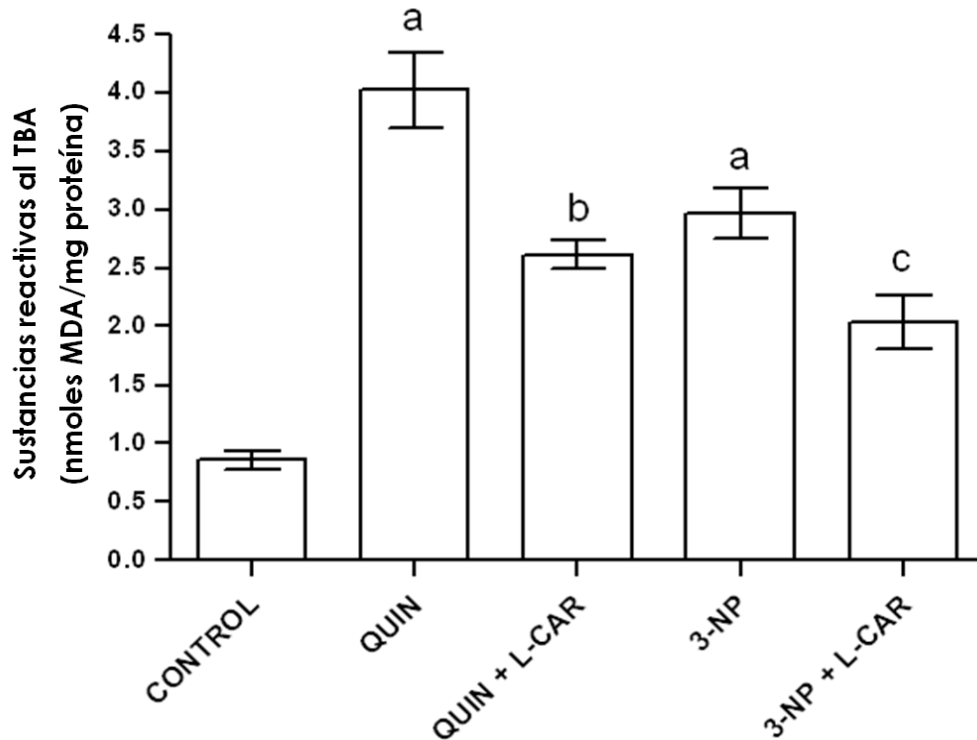
**Figura 18.** Efecto de SAC (300 mg/kg/día *i.p.* por 7 días) sobre las alteraciones motoras inducidas por QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L) en ratas. Después del reto con apomorfina, la conducta de rotación se evaluó durante 60 minutos. Cada barra representa el valor medio de los giros que se presentaron en cada grupo experimental  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $P < 0.01$ , diferente del control; <sup>b</sup> $P < 0.01$ , diferente del QUIN; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , diferente de 3-NP; tras realizar las pruebas de Kruskal–Wallis y Mann–Whitney.

Los grupos que recibieron el postratamiento diariamente durante siete días con SAC (fig. 18), presentaron patrones de conducta muy similares, casi idénticos a lo que se apreciaron en la gráfica anterior (fig. 17). El grupo control presentó actividad de rotación casi nula, notándose que las neurotoxinas, efectivamente, provocaron un daño cerebral puesto que incrementaron de sobremanera los giros de 360° en los animales. En el caso del QUIN, las ratas dieron en promedio 100 giros; mientras que con el 3-NP, 75. Por otro lado, también se puede apreciar una disminución importante en el número de giros en los grupos administrados con SAC. Nuevamente, el antioxidante mostró un efecto más positivo ante el daño evocado por QUIN que ante 3-NP. En el grupo QUIN+SAC, los giros se redujeron aproximadamente en un 95-98%, pues las ratas dieron 5 en promedio. En cambio, en el grupo 3-NP+SAC, el comportamiento aberrante se redujo en un aproximado de 75%, pues las ratas presentaron entre 20 y 30 giros. A pesar de ser ésta una disminución importante, no es tan pronunciada como en el caso QUIN+SAC.

## **9.2 Disminución del daño a los lípidos de membrana**

En las figuras 19 y 20 se puede observar que de manera natural, en condiciones control, los lípidos de las membranas celulares tienden a sufrir peroxidación. Sin embargo, es evidente que ante la presencia del QUIN y 3-NP, ésta se acentúa. En la figura 19 se muestran los daños causados a la membrana 7 días después de haber practicado la operación estereotáxica y se puede notar que debido al tiempo que han tenido las toxinas para actuar, el deterioro es mayor comparado con los resultados obtenidos a tiempos cortos (fig. 20), pues la cantidad encontrada de MDA demuestra que los ácidos grasos y lipoproteínas de la membrana celular han sido atacados por radicales, resultando en la formación de dicho compuesto. La cantidad de lípidos dañados a causa del QUIN es mayor que la del 3-NP.

Los efectos que tuvo la administración subcrónica de L-CAR (100 mg/kg) se aprecian en la figura 19. Hubo una disminución del daño, la L-CAR fue capaz de ejercer su acción antioxidante, contrarrestando que la membrana de la célula sufriera percances provocados por el aumento de ERO yERN que resultan del insulto tóxico recibido. En el caso del QUIN, L-CAR redujo la cantidad de lípidos peroxidados en poco menos del 40%, comparando los resultados con el grupo que recibió únicamente el vehículo. Por otro lado, el efecto de la L-CAR en presencia del 3-NP fue muy similar, pues a pesar de que la concentración de lípidos dañados por este compuesto fue menor que los provocados por el QUIN, sólo logró reducir aproximadamente un 30% los ácidos grasos poliinsaturados transformados en MDA.

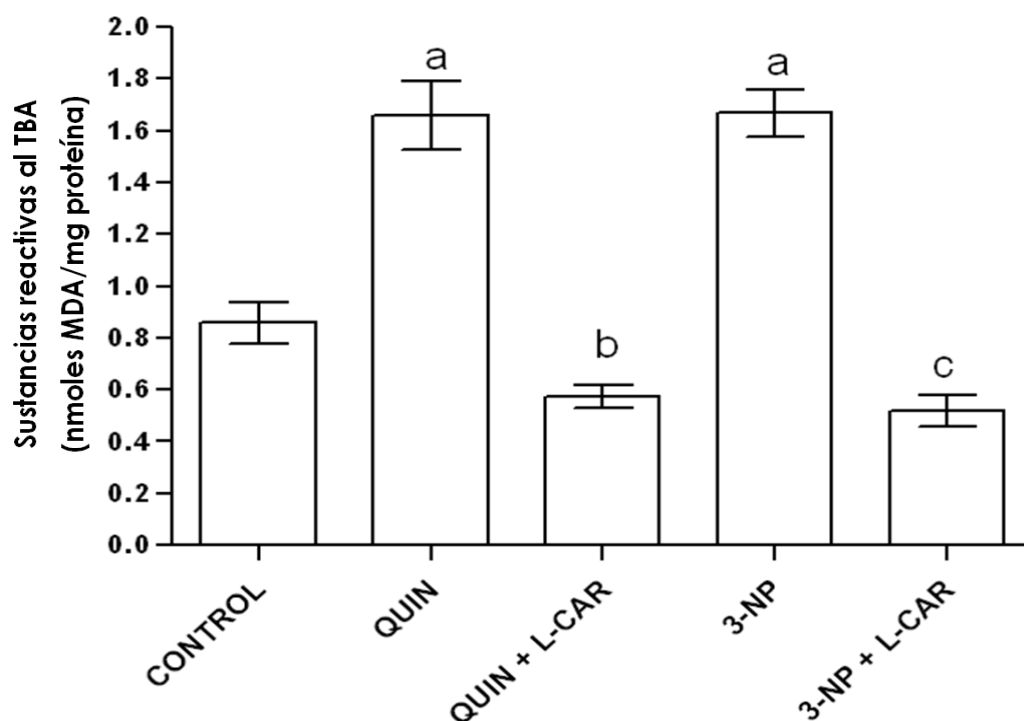


**Figura 19.** Efectos de L-CAR (100 mg/kg) suministrado por 7 días consecutivos post-lesión sobre la peroxidación de los lípidos de membrana que se presenta tras la infusión intraestriatal de QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L). Cada barra representa el valor medio  $\pm$  EEM de una  $n = 6$  ratas por grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  diferente del control; <sup>b</sup> $P < 0.05$  diferente del QUIN; <sup>c</sup> $P < 0.05$  diferente de 3-NP. Estos datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Por otro lado, la figura 20 muestra que en el diseño agudo o de tiempos cortos (4 horas después de haber recibido la lesión en el estriado), la cantidad de lípidos peroxidados es más pequeña que aquella que se logró a los 7 días (fig. 19) y que nuevamente, el postratamiento con L-CAR reduce el daño a la membrana (la cantidad de lípidos peroxidados), incluso por debajo de los valores obtenidos en el grupo control que sólo recibió solución salina en lugar de un insulto tóxico y un tratamiento. En este caso, la actividad oxidante del QUIN y el 3-NP fue similar, pues la cantidad de sustancias reactivas al TBA fue casi la misma. También en las dos situaciones la L-CAR actuó de manera similar, mostrando el mismo grado de efecto protector: redujo en aproximadamente 60% la cantidad de sustancias resultado del EO causado por los agentes tóxicos en cuestión.

Notablemente, mientras en el diseño a tiempos medios las mediciones hechas a los sinaptosomas de animales que recibieron L-CAR señalan una disminución en los lípidos peroxidados en relación con los grupos que no obtuvieron el tratamiento, estos son muy superiores (casi tres veces más) a los valores obtenidos para la condición control (fig. 19). En cambio, a tiempos cortos (fig. 20), la L-CAR no sólo mostró una disminución efectiva del daño

oxidante en relación con los grupos que recibieron toxina y vehículo, incluso está por debajo de los datos que semejan las condiciones normales de los animales.

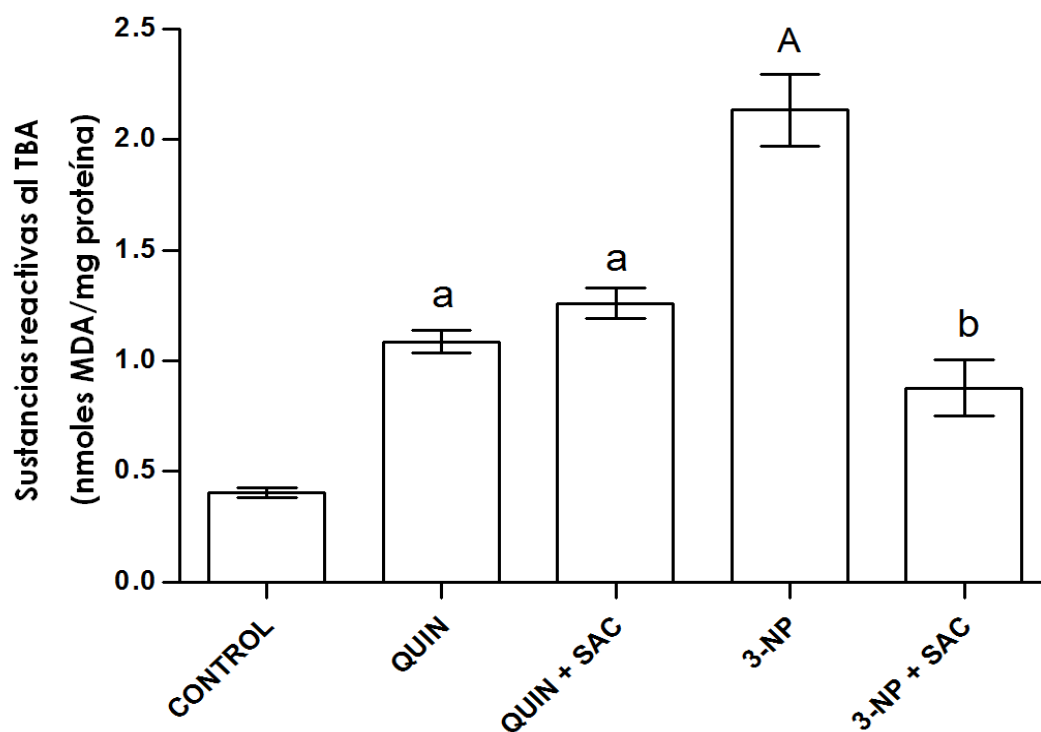


**Figura 20.** Peroxidación lipídica tras 4 horas de haber recibido la lesión intraestriatal de QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L) y los efectos de la administración de L-CAR (100 mg/kg, *i.p.*) dos horas después del insulto tóxico. Cada barra representa el valor medio  $\pm$  EEM de una  $n = 6$  ratas por grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  diferente del control; <sup>b</sup> $P < 0.05$  diferente del QUIN; <sup>c</sup> $P < 0.05$  diferente de 3-NP. Estos datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Debido a limitantes diversos, no se pudieron completar los grupos que recibieron un postratamiento con SAC. Únicamente se pudieron formar los grupos del tratamiento subcrónico, es decir, aquellos que recibieron una administración diaria por 7 días de SAC (300 mg/kg), desde el momento en que recibieron la infusión tóxica.

En la figura 21 pueden observarse los efectos de SAC. Al igual que en las figuras 19 y 20, se aprecia que en condiciones control hay una cantidad mínima de lípidos dañados por radicales libres. Tanto el QUIN como el 3-NP muestran un incremento en la afectación de los componentes de la membrana celular, siendo casi 50% menor la cantidad de sustancias reactivas con QUIN que con 3-NP. El postratamiento durante 7 días con SAC mostró diferentes resultados. En presencia del QUIN la administración del antioxidante parece no tener efecto, pues en vez de reducir la peroxidación, la incrementó ligeramente con respecto a las ratas postratadas con vehículo; por la similitud en los resultados, se podría

decir que la respuesta de ambos grupos fue la misma, que el SAC no logró ejercer su acción como molécula correctiva. Por otra parte, la efectividad de este compuesto fue positiva en los animales lesionados con 3-NP, pues el nivel de daño disminuyó a la mitad, contrastando con el grupo de 3-NP que no recibió SAC como postratamiento.



**Figura 21.** Lípidos peroxidados tras el tratamiento subcrónico con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L) y el efecto de SAC en las fracciones sinaptosomales que recibieron una dosis diaria de 300 mg/kg durante 7 días. Cada barra representa el valor medio de una *n* de 6 ratas por grupo  $\pm$  EEM. <sup>a</sup>*P*<0.05 y <sup>A</sup>*P*<0.01, diferente del control; <sup>b</sup>*P*<0.05 diferente de 3-NP. Se realizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

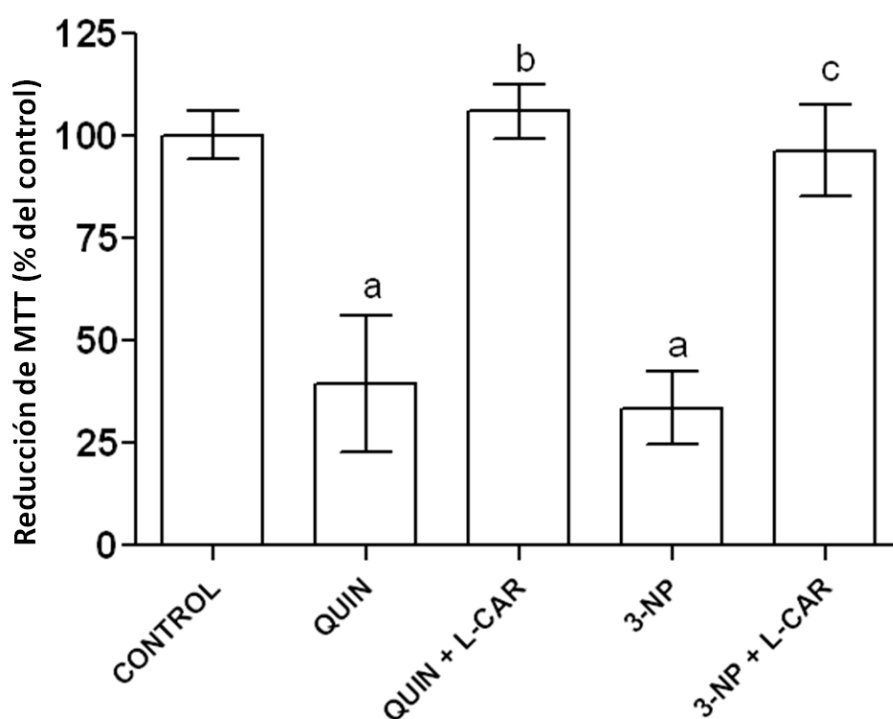
Cabe resaltar que ni en el grupo QUIN+SAC, ni en 3-NP+SAC los niveles de daño llegaron a reducirse al grado de igualarse al control, es decir, no se lograron restablecer las condiciones iniciales de los animales en términos de daño a la membrana.

### 9.3 Rescate de la actividad mitocondrial

Otro modo de determinar la posible protección a las células, fue evaluando la actividad de la cadena respiratoria y la mitocondria a través del ensayo de reducción de MIT a cristales de formazán en fracciones sinaptosomales aisladas.

El suministro de 100 mg/kg diario por 7 días de L-CAR tuvo ciertos efectos que son observables en la figura 22. El grupo control (sólo tratado con

solución salina) se tomó como referencia para cuantificar la actividad óptima de la mitocondria, es decir, la capacidad del complejo II de la succinato deshidrogenasa para operar al 100%, reduciendo el MTT a formazán a través de su actividad. Los efectos nocivos provocados por el QUIN y 3-NP después de una semana fueron obvios, pues la funcionalidad mitocondrial se redujo en ambos casos a 37 y 35%, respectivamente. Los grupos QUIN+L-CAR y 3-NP+L-CAR, en cambio, mostraron el restablecimiento de la actividad mitocondrial en su totalidad, pues en ambos casos los datos indicaron que la capacidad reductora del organelo estaba actuando a su máxima capacidad, como si las toxinas no hubieran provocado daño alguno.



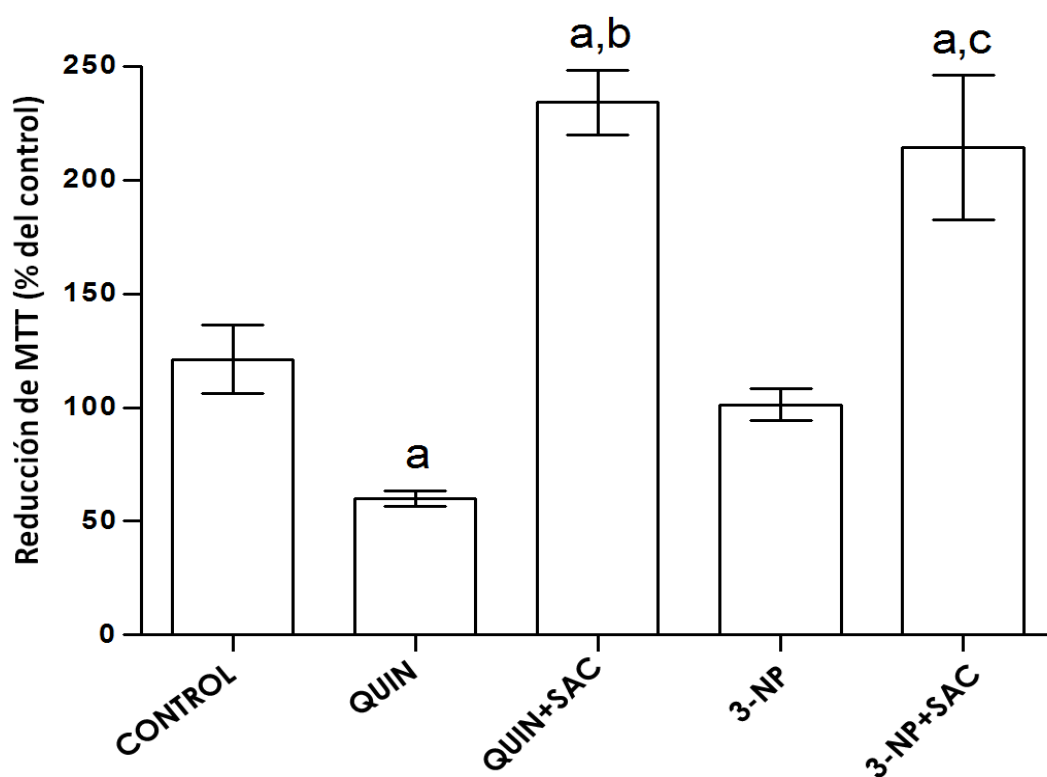
**Figura 22.** Funcionalidad de la mitocondria tras la lesión con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L) y los efectos de L-CAR (100 mg/kg) al ser recibida *i.p.* como postratamiento por 7 días consecutivos. Cada barra representa el valor medio  $\pm$  EEM de una  $n = 6$  ratas por grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  diferente del control; <sup>b</sup> $P < 0.05$  diferente del QUIN; <sup>c</sup> $P < 0.05$  diferente de 3-NP. Estos datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

A las 4 horas de haber sido operadas, el funcionamiento mitocondrial en los sinaptosomas fue muy diferente, pues a pesar de que las dos toxinas provocaron que la actividad mitocondrial decayera (el QUIN lo hizo en un 35 y el 3-NP en un 46%), en los grupos en los que el antioxidante fue aplicado no se observaron resultados significativos, es decir, el efecto de la L-CAR no difirió con respecto a los grupos que sólo recibieron solución salina posterior a la lesión con los agentes tóxicos (datos no mostrados).



El caso de SAC es particular. Como ya se mencionó, por razones que estuvieron más allá de lo planeado, sólo se pudo trabajar con el grupo de animales que recibieron el tratamiento subcrónico (7 días) de 300 mg/kg de SAC.

En la figura 23 se observa que las toxinas disminuyeron la actividad de la mitocondria en términos de la reducción de MTT a cristales de formazán. No obstante, la presencia de SAC en el organismo de los roedores no mostró ser protectora. Al parecer, las toxinas deterioraron a tal grado la acción del complejo II de la cadena respiratoria que la mitocondria se valió de otro tipo de deshidrogenasas para que dicha reducción pudiera llevarse a cabo, pues los valores fluctúan alrededor de una actividad del 200%.



**Figura 23.** Efectos de SAC (300 mg/kg) sobre la funcionalidad de la mitocondria tras la lesión con QUIN (240 nmol/ $\mu$ L) o 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L), al ser recibida *i.p.* 7 días consecutivos después de haber realizado la lesión estriatal a los animales. Cada barra representa el valor medio  $\pm$  EEM de una  $n = 6$  ratas por grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  diferente del control; <sup>b</sup> $P < 0.01$  diferente del QUIN; <sup>c</sup> $P < 0.01$  diferente de 3-NP. Estos datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

*La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.  
Es un viaje, nunca una llegada.  
Karl Popper*

## 10. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que ante un insulto tóxico en el sistema nervioso, específicamente alguno que represente las características de un componente excitotóxico, existen ciertas sustancias con mecanismos de acción antioxidantes y proenergéticos que pueden revertir estos fenómenos aún cuando haya comenzado a ocurrir la degeneración.

La hipótesis de que el EO es el mecanismo crónico que dirige la neurodegeneración está sustentada en el daño acumulativo de éste, asociado con el inicio retardado de la enfermedad (en la etapa adulta mediana), así como con la naturaleza progresiva de la EH y otros desórdenes de este tipo (Kim & Chan 2002). Hasta ahora continúa siendo imposible discernir si el EO es causa o consecuencia de los desórdenes neuropatológicos (Andersen 2004).

Tanto el QUIN como el 3-NP son aceptados como modelos fenotípicos de la EH, pues son incapaces de producir la expresión de la proteína Htt mutada que desencadena la patología; sin embargo, pueden semejar la mayoría de las características y procesos, desde el nivel molecular hasta el organísmico, que ocurren durante el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa (Brouillet *et al.* 2005). El QUIN sólo logra penetrar la barrera hematoencefálica de manera muy pobre (Sas *et al.* 2007) y su síntesis es casi nula en el cerebro a pesar de que se produce en cierta cantidad en las estructuras cerebrales durante el desarrollo temprano de la enfermedad (Schwarcz *et al.* 1980; Guidetti *et al.* 2006). Por ese motivo, fue administrado directamente en el estriado. Lo mismo ocurrió con el 3-NP, pues a pesar de que por vía sistémica la micotoxina mantiene una vulnerabilidad selectiva hacia el caudado-putamen, se sabe que en ocasiones el daño también se manifiesta en otras áreas del encéfalo pero en menor proporción. Esta posibilidad disminuye al realizar la inyección directamente al estriado (Reynolds *et al.* 1997). El QUIN se ha convertido en un excelente modelo para representar los síntomas tempranos de la EH; debido a que el 3-NP produce daños más severos, por lo que se le tipifica como modelo de las características tardías (Sas *et al.* 2007). Cabe señalar que este último dato sigue siendo controversial. Es sabido que los efectos neurotóxicos del QUIN y el 3-NP involucran mecanismos de acción similares que resultan en el daño estriatal en combinación con la alteración, en menor grado, a otras estructuras extraestriatales (Bazzet *et al.* 1996b), pero ambos modelos resultan complementarios, pues el tratamiento con QUIN produce algunas de las características conductuales y neuroanatómicas que pueden apreciarse en las etapas tempranas de la EH, mientras que el 3-NP produce los efectos más

severos que imitan aquellos que tienen lugar en las etapas tardías y en los cuadros juveniles de la EH (Shear *et al.* 1998).

El deterioro de las funciones cognitivas en la EH corre paralelo a la progresión de los defectos motores (Borlongan *et al.* 1997). Los modelos excitotóxicos no reproducen esta “progresión” de la enfermedad; el 3-NP, en cambio provoca una hiperactividad sostenida (EH en etapas tempranas) e hipoactividad (fase tardía de la EH); lo que sugiere que este modelo fenotípico puede usarse para emular el avance de la enfermedad (Borlongan *et al.* 1995).

Al actuar en diseños sinérgicos con dosis subtóxicas se ha demostrado que el 3-NP modifica la toxicidad del QUIN; se cree que dicho proceso está asociado con un incremento en la actividad de las calpaínas que median el corte proteolítico de diversas proteínas en las neuronas postsinápticas, sugiriendo una mayor desregulación de las concentraciones neuronales del  $Ca^{2+}$ . Cuando se administró 3-NP sistémicamente (*s.c.*) a ratas Lewis a través de bombas miniosmóticas, liberando 10-45 mg/kg/día durante 6 días. El día 5 después de la implantación se practicó la inyección estereotáxica unilateral de 1  $\mu$ L de QUIN (4, 10, 15, 20, 40, 80, 120, 180 nmol). Se revelaron 3 aspectos clave de la potenciación de la excitotoxicidad por medio de defectos crónicos en la cadena respiratoria: primero, la potenciación ocurre en un rango restringido de defectos en el complejo II de la mitocondria; segundo, la potenciación lleva a la exacerbación de la activación de las calpaínas, indicando que se ha dado una desregulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ ; tercero, esta desregulación asociada con la potenciación no está vinculada con la hipersensibilidad de los receptores NMDA. El 3-NP disminuyó el umbral del QUIN requerido para ocasionar lesiones tóxicas, lo que quiere decir que la activación no tóxica de los receptores NMDA combinada con la inhibición no tóxica en el complejo II de la mitocondria puede actuar de manera sinérgica en la degradación del estriado (Jacquard *et al.* 2006).

Al decir que el uso de SAC y L-CAR como postratamientos a las toxinas resultará ser benéfico para el funcionamiento e integridad neuronal, es evidente que no se puede hablar de que todos los mecanismos de neurodegeneración que tienen lugar en la EH sean frenados o solucionados a través de alguna de ellas, pues los parámetros medidos no brindan evidencia para tal argumento. Para esto, se tendrían que hacer análisis más complejos que involucraran la genética de la enfermedad y el daño a otras biomoléculas. En cambio, puede decirse que ha ocurrido una reactivación importante de funciones neuronales, tanto en términos de la homeostasis cerebral y la actividad motora en el organismo vivo (medida por medio de la conducta de giro), como de la actividad de un organelo crucial para la supervivencia (reducción de MIT a formazán en la mitocondria) y de la integridad celular, pues el daño provocado a la membrana y otros lípidos por ER se redujo.

La medición de la conducta de rotación no puede tomarse como una referencia absoluta del grado de daño que ha ocurrido en el cerebro de los animales. Más que un método cuantitativo para evaluar el daño, se trata de una aproximación cualitativa, pues la exacerbada presencia de giros es indicativa de una descompensación neuroquímica y funcional. Esta descompensación es resultado de la lesión unilateral en el estriado de las ratas y representa un índice que califica el déficit neuroquímico reflejado como un desbalance en la transmisión dopaminérgica (Pérez-De la Cruz *et al.* 2005). La tendencia a ejecutar giros transitorios de este tipo, mayoritariamente ipsilaterales, está asociada con la inhibición de la vía nigroestriatal en el lado lesionado (Miranda *et al.* 1999). El desbalance funcional no se hace evidente de manera espontánea; para la inducción de esta conducta es necesaria la presencia de un agonista de receptores dopaminérgicos (la APM) y al estar dañado uno de los estriados (anatómica, fisiológica y estructuralmente). La APM sólo podrá actuar sobre aquel que conserve la entereza de sus componentes, generando de esta manera que se produzcan giros ipsilaterales a la lesión. Como ya se dijo, APM es un agonista de la DA, produce el incremento a corto tiempo en el poder y sincronía de las redes oscilatorias de alta frecuencia (22-32 HZ) de la corteza-ganglios basales, las cuales preceden la asimetría rotacional en el comportamiento. A su vez, incrementa los niveles extracelulares de Glu en el estriado, lo cual supone el involucramiento de la transmisión glutamatérgica en las acciones neuromoduladoras de la DA. Además, se ha convertido en el modelo típico para la determinación del daño neuronal ocasionado en un solo hemisferio cerebral (Vorobyov & Sengpiel 2008).

Las figuras 17 y 18 permiten observar que en presencia de los antioxidantes (L-CAR y SAC, respectivamente), el daño conductual provocado por las toxinas se atenúa. En ausencia de estos, los animales lesionados dan alrededor de 100 giros y cuando reciben alguno de los tratamientos disminuyen sustancialmente. Al ser usados L-CAR y SAC como postratamiento, no se puede hablar de que exista una prevención de los efectos nocivos provocados por la excitotoxicidad y el déficit energético resultado de la infusión de QUIN y 3-NP. Más bien, existe una acción “correctiva”. Esto se debe a la capacidad que tienen los compuestos para atrapar radicales libres y, uno de ellos, para evitar que los niveles de ATP continúen bajando, e impidiendo que la célula caiga en estrés, pues las neuronas tienen muy altos requerimientos energéticos y, por tanto, son sumamente sensibles a ligeras disminuciones en las concentraciones de ATP (Bonsi *et al.* 2006). Nuestros resultados muestran que la L-CAR y la SAC (figs. 17 y 18) actúan como protectores ante la presencia de las toxinas, preservando la integridad (al menos estructural) del caudado-putamen, recuperando en presencia del QUIN las funciones normales de las células estriatales y en el caso del 3-NP, ubicándolas un 25% por debajo de la integridad basal en términos del desbalance

en la transmisión sináptica. Aún así, establecen una mejora, lo que representa una evidencia de que el 3-NP suele ser más agresivo que el QUIN (Borlongan *et al.* 1995).

Se sabe que la L-CAR, además de ser una molécula proenergética al desempeñar un papel importante en la obtención de energía durante el metabolismo de los ácidos grasos. También mejora la actividad antioxidante endógena e inhibe la formación de lípidos peroxidados a través de la acción quelante que ejerce, reduciendo la disponibilidad de  $Fe^{2+}$  para promover la reacción de Fenton y generar una de las especies más reactivas con un amplio espectro de daño: el  $OH^{\bullet}$  (Gülçin 2006). En las figuras 19 y 20 puede verse que en los modelos subcrónico y agudo el QUIN elevó la concentración de sustancias reactivas al TBA, indicando que no sólo causa la activación excesiva de los receptores NMDA y la subsecuente entrada masiva de  $Ca^{2+}$ , sino que posiblemente favorece la producción de radicales libres y ER de manera severa, provocando que el estatus oxidante de la célula sea desfavorable. El EO que origina el metabolito de las KYN en cuestión, es un suceso determinante. Lo distingue principalmente su acción excitotóxica, pero el influjo masivo de  $Ca^{2+}$  resultado de ésta, causa daño a la mitocondria, provocando que se abran poros en la membrana del organelo y se liberen al citoplasma elementos importantes de la cadena de transporte de electrones, como el citocromo c. Todos estos disturbios son los causantes de que no se logre la reducción completa del oxígeno y que se genere un desbalance en la producción de ER. Es importante recordar que en presencia del QUIN, el  $Fe^{2+}$  se acumula y aunque el QUIN actúa como un quelante, pues atrapa al metal, no lo hace inocuo, sino que el complejo QUIN-hierro (II) propicia la reacción de Fenton (Santamaría *et al.* 2001). Esto demuestra que el QUIN no es sólo un agente excitotóxico, sino también prooxidante, así como un factor desacoplante de la mitocondria (Pérez-De la Cruz *et al.* 2008). En ambos esquemas de administración ocurrió algo semejante con la micotoxina. Se considera típicamente al 3-NP como un inhibidor metabólico que bloquea de manera irreversible la actividad de la SDH. No obstante, hay que recordar que el bloqueo de tal complejo no sólo provocará una disminución severa en las reservas de ATP al interrumpir su síntesis, pues el freno a la correcta transferencia electrónica causa que el oxígeno se reduzca de manera parcial, generando ERO y ERN en el proceso que alteran la homeostasis celular dañando a sus componentes. También trastorna el correcto funcionamiento de algunas enzimas que se encargan de destoxificar a las neuronas, en este caso, resultando en la aparición de eventos de estrés que suelen propagarse hasta que desembocan en la muerte. Algunos de esos procesos son la generación de lípidos peroxidados, que tras la aplicación de la prueba de TBA resultan en la aparición elevada de sustancias (lípidos peroxidados) que reaccionan ante ella. Es fundamental señalar que existen diversas evidencias que constatan que las toxinas

usadas como modelo fenotípico de EH son capaces de inducir la formación de diferentes ERO y ERN durante su fase aguda de toxicidad, la cual va de minutos a un par de horas (Pérez-De la Cruz *et al.* 2005).

Este trabajo muestra evidencia importante de que posterior a la lesión con QUIN o 3-NP, el suministro de L-CAR en un modelo *in vivo* es capaz de frenar y revertir la PL que se presentaba en los animales tratados únicamente con alguno de los tóxicos. Un punto muy relevante es que se demostró que la protección de L-CAR no sólo es efectiva unas cuantas horas después de haber practicado la cirugía esterotáxica, sino que el estímulo neuroprotector continúa al ser prolongado el tratamiento por varios días (una semana, en este caso). Se sabe que la L-CAR previene el EO y regula la producción de NO<sup>•</sup>, la respiración celular y la actividad de enzimas involucradas en la defensa contra daño oxidante. Ante la toxicidad inducida por 3-NP, ejerce un efecto protector en la actividad de la SDH, CAT, GPx y SOD, evitando, de esta manera, un daño peroxidante mayor (Binienda & Ali 2001; Gülçin 2006). Quizá en este caso, sea esa la característica de la L-CAR LA que revierte el daño a los lípidos de la membrana, pues al conservar la actividad óptima de las moléculas antioxidantes se hacen inocuas las ER, evitando que reaccionen con los ácidos grasos membranales. El trabajo de Silva-Adaya y colaboradores (2008) demostró que los efectos neuroprotectores de L-CAR ante 3-NP pueden deberse a la potenciación de la energía mitocondrial a través de vías alternas, como son los recursos energéticos a partir de cuerpos cetónicos, el aumento del metabolismo oxidante que previene la acumulación de lactato y la preservación de fosfolípidos de membrana previniendo la acumulación de acil-CoA, pero no por una interferencia directa con la succinato deshidrogenasa. Adicionalmente, la L-CAR suprime la transición de permeabilidad de la membrana, la apoptosis inducida por Fas y la producción de ceramidas (Furuno *et al.* 2001); promueve la disponibilidad de energía para la célula y previene la acumulación tóxica de ácidos grasos de cadena larga (Sima 2007). Otra explicación plausible para las acciones positivas de L-CAR es su actividad antiapoptótica, observada en un modelo de MPP<sup>+</sup> que involucra la regulación de la expresión de Bax y Bcl-2 en la membrana mitocondrial; dichos genes están relacionados con la estabilización de la permeabilidad de la membrana, ya que preservan la integridad mitocondrial, inhiben la liberación de citocromo c e impiden la muerte celular (Wang *et al.* 2007). Es interesante que en los análisis de daño a 4 horas (con la aplicación del antioxidante dos horas después de haber recibido la toxina), los valores de PL hayan quedado muy por debajo de los presentados en la situación control; lo que probablemente quiere decir que, a tiempos cortos, la L-CAR puede desempeñar mejor sus acciones pues tal vez los radicales libres que se han formado no han logrado reaccionar con algún blanco celular, generando un grado de protección altamente confiable. Sin embargo, es importante observar que la cantidad de lípidos peroxidados a la

semana de haber ocurrido el proceso se disparó de forma importante, señalando quizá no una menor eficacia en el modo de acción de la L-CAR, sino una disminución coherente con el daño ocasionado. Al revisar las figuras 19 y 20 se aprecia que en términos de proporción, la atenuación del daño a estructuras lipídicas es la misma.

A diferencia de lo que ocurre con el daño a lípidos de membrana, la funcionalidad mitocondrial sólo puede ser reestablecida tras 7 días de aplicación continua de una dosis de 100 mg/kg de L-CAR (fig. 22), pero si el tratamiento sólo es recibido 2 horas después de haber practicado la lesión, el compuesto parece no ejercer beneficio alguno (datos no mostrados). Quizá esto se deba a que, a pesar de que la L-CAR se distingue por ser un importante precursor energético, el hecho de que en las neuronas la  $\beta$ -oxidación (proceso alternativo de producción de energía promovido por la L-CAR) sea mínima, puede ser un freno importante para que se vean reflejados de manera inmediata los efectos de la misma. Para empezar, es probable que su cualidad de restablecer los niveles energéticos celulares no se vea reflejada de manera inmediata pues dicho suceso forma parte de un proceso que involucra reacciones en las que intervienen más elementos aparte de la L-CAR. Aunque también actúa como antioxidante, tal vez esta actividad sea débil comparada con el daño evocado por las neurotoxinas. La fig. 22 muestra que después del tratamiento prolongado y constante con L-CAR sí hay una recuperación de las funciones de la mitocondria. Esto podría estar confirmando las hipótesis anteriores, pues transcurrido el tiempo, se da lugar a que procesos más largos (como una vía metabólica alterna) puedan efectuarse, restableciendo o elevando los niveles de ATP que decayeron a causa del QUIN y el 3-NP, y que la acumulación de la sustancia en el organismo potencie los efectos antioxidantes, incluso devolviendo a las células la actividad normal de la cadena respiratoria.

La manera de comportarse de SAC es aún más controversial. Como ya se discutió, la administración de este compuesto posterior a alguna toxina atenuó la conducta de rotación en los roedores y el daño oxidante se detuvo en presencia del compuesto evitando que continuara el deterioro de los componentes estriatales (fig. 18). A pesar de este resultado positivo, los valores de las otras dos pruebas realizadas (también a los 7 días) no fueron contundentes.

En el caso de la PL en sinaptosomas estriatales obtenidos de ratas lesionadas, la figura 21 permite observar que SAC únicamente pudo ejercer sus funciones antioxidantes para preservar el estado redox de la célula en presencia de 3-NP, pues los lípidos dañados disminuyeron en un 66% con respecto al grupo que sólo recibió la toxina. Ésta actuó eficazmente como molécula secuestradora de radicales libres, previniendo el daño oxidante y preservando la integridad de la respiración mitocondrial (Pérez-De la Cruz *et al.* 2006). En cambio, al aplicar el compuesto antioxidante 120 minutos después de haber

lesionado con QUIN, prácticamente no hubo cambios. De hecho, el valor de las sustancias reactivas al TBA del grupo QUIN+SAC fue ligeramente superior al grupo que recibió la toxina y solución salina, por lo que en términos de significancia estadística no hubo cambios. Tal vez esto se deba a la naturaleza de las especies reactivas generadas por los modelos tóxicos. Es posible que SAC responda mejor ante un daño por EO cuyo origen proviene de las ERO generadas por la actividad mitocondrial que por otros mecanismos como puede ser la excitotoxicidad o la formación del complejo QUIN-hierro (II). Al estar el 3-NP más ligado al primer patrón de toxicidad y el QUIN a los otros dos mencionados, fue que la SAC pudo reaccionar más eficazmente y frenar los efectos adversos. Esta idea está fundamentada parcialmente en un trabajo de 2007 de Medina-Campos y colaboradores, donde se demuestra que SAC tiene una manera diferencial de atrapar radicales libres. La propuesta de dicha investigación es que la SAC reacciona muy eficientemente con el oxígeno singlete y el ácido hipocloroso, pero pobremente con  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$ ; no obstante, se ha dicho que SAC actúa mejor ante las ERO provenientes de la actividad mitocondrial y dos de las más importantes, son precisamente, el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$ . Aún falta hacer estudios al respecto, pero puede vislumbrarse que se trata de un mecanismo de captación diferencial de ER y radicales libres. Esto indica que posterior a la infusión con QUIN, la nula acción de SAC (administrada durante 7 días) ante la nociva oxidación de los lípidos de membrana, se debe más a la ineffectividad del agente antioxidante que al grado de daño originado por QUIN, pues las figuras 19 y 22 muestran que la L-CAR sí pudo revertir satisfactoriamente las alteraciones provocadas tanto a los lípidos como a la mitocondria bajo el tratamiento subcrónico. Por tanto, no se trata de que el daño provocado por el metabolito del triptófano sea reversible para ese momento, sino que el modo de combatir sus efectos no es el adecuado.

Todavía resulta más difícil de explicar la fallida acción de SAC tratando de preservar las funciones de la mitocondria tras la administración diaria por 7 días después de haber lesionado el estriado con las respectivas toxinas (fig. 23). Por un lado, el hecho de que la barra que representa las fracciones sinaptosomales del grupo control exceda del 100% la actividad del complejo II de la mitocondria, medido a través de la transformación de MITT a formazán, indica que los valores de las muestras resultaron ser muy dispersos. Es congruente que en presencia de las moléculas inductoras de daño neuronal la reducción de MITT haya disminuido, lo que no tiene sentido es que dicha disminución no sea marcada. En la figura 22 donde se representó el tratamiento con L-CAR, la actividad de la mitocondria cayó drásticamente, y en este caso, ante QUIN disminuyó en un 40%; pero en presencia de 3-NP, el decaimiento de la funcionalidad fue apenas perceptible (5-10%). Lo que resulta aún más peculiar es que en presencia de SAC la reducción a cristales de formazán es superior a los valores considerados como



la reducción absoluta en la condición control. Hay varias explicaciones para este fenómeno. La primera es que el grupo de ratas con el que se trabajó haya resultado ser menos vulnerable a los efectos de los tóxicos por azar, por la variabilidad o susceptibilidad biológica. La segunda es que SAC no es tan efectiva para restablecer la funcionalidad de la mitocondria como lo fue para lograr el balance del estatus redox de las neuronas. Esto podría deberse a que su actividad se enfoca más en atrapar ER que en restablecer funciones que tengan que ver con el metabolismo energético de la célula. La tercera, podría relacionarse nuevamente con la manera diferencial con que lleva a cabo la inactivación de radicales y ER. El ensayo realizado no permite decir con exactitud qué mecanismo ha ocurrido para que los niveles de reducción del MTT hayan aumentado en un 150%, aunque usualmente no se trata de resultados alentadores. De manera normal el MTT se convierte a formazán a través de las deshidrogenasas. Cuando algunas toxinas inhiben directa o indirectamente el complejo II de la cadena mitocondrial (la SDH), la enzima ya no puede llevar a cabo la actividad reductora y, por tanto, ya no alcanza los niveles de formazán que se presentaron cuando la función de la enzima estaba íntegra. Sin embargo, hay ocasiones en las que el daño oxidante que se produce es demasiado y se incrementa la presencia de  $O_2^{\bullet-}$ , lo cual representa un problema, pues también tiene la capacidad de realizar la reacción que transforma el MTT a cristales de formazán y es entonces cuando los resultados parecen superar la función estándar de las deshidrogenasas. También puede ser que SAC haya desempeñado su acción protectora y que haya potenciado la actividad de la SDH, incrementando su actividad reductora y llevando los niveles de formazán más allá de los niveles control, no obstante, este comportamiento, benéfico en un inicio, puede convertirse en aberrante, ya que al haber un desbalance de funciones se generan alteraciones finalmente. Hay que recordar que en los sistemas biológicos, las toxinas pueden actuar como agentes benéficos y viceversa, dependiendo de las dosis y las circunstancias (Benzie, 2000), todo depende del contexto celular en que nos situemos.

Aún falta averiguar si SAC resulta efectiva al ser empleada dos horas después de haber administrado las toxinas, y de esta manera determinar si correlacionan con los resultados de los tratamientos subcrónicos y así poder explicar lo observado. De esta manera, las respuestas evocadas por este derivado del ajo podrían ser mejor analizadas. A pesar de los tropiezos encontrados en el método experimental aquí descrito, SAC resulta ser un compuesto bastante prometedor que brinda alternativas para explorar métodos terapéuticos contra enfermedades neurodegenerativas con componentes oxidantes, excitotóxicos o inflamatorios (Pérez-Severiano *et al.*, 2004a).

La importancia de los datos obtenidos en este trabajo radica en dos puntos principalmente. Por una lado, que se trata de un diseño experimental manejado

en sistemas vivos, donde el factor de estudio se involucra con diversas variables y fenómenos que ocurren en el organismo. Por otro lado se trata de un diseño novedoso, pues no se habían administrado las sustancias antioxidantes como postratamiento. El que se administren después y no antes es crucial, pues muestra que son efectivas no sólo previniendo el daño, sino defendiendo la viabilidad de las células una vez que los procesos de daño se han iniciado. Sin embargo, la extrapolación de estos datos hacia los humanos con EH es difícil (Hickey & Morton 2000). Aún cuando los resultados arrojan datos suficientes para saber que las sustancias empleadas tienen propiedades favorables para combatir el daño neuronal generado por EO, no se extendieron lo suficiente. Este trabajo sólo arrojó datos en términos de recuperación funcional de las células después de inducido el daño; aunque es información sumamente relevante, tendrían que tomarse en cuenta muchos más indicadores y realizar pruebas adicionales tanto *in vivo* como *in vitro* para hacer la absoluta caracterización del compuesto y decidir si se lleva la investigación a un nivel más elevado y así ir aumentando el grado de complejidad en las variables medidas, hasta que finalmente, los resultados producto de diversos estudios permitan la creación de algún fármaco o forma de terapia.

Es cierto que la medicina se beneficia a través del estudio de diferentes compuestos con actividad antioxidante y proenergética, que si bien podrían no actuar como el proceso terapéutico absoluto, sí como un co-tratamiento que ayude a disminuir los efectos de enfermedades donde el EO tenga un papel preponderante (Cemeli *et al.* 2009). Sin embargo, no se puede pasar por alto que incluso las terapias antioxidantes pueden tener efectos negativos, como la interrupción de las funciones benéficas o fisiológicas de algunas ERO (Knott *et al.*, 2008) a nivel de sistema inmunológico principalmente.

*La Evolución, ¿una teoría, un sistema, una hipótesis? De ninguna manera, mucho más que eso: una condición general a la cual deben doblarse, para ser posibles y verdaderas, todas las teorías, todas las hipótesis, todos los sistemas. Una luz esclareciendo todos los hechos, una curvatura a la cual deben amoldarse todos los rasgos: he aquí lo que es la Evolución.*  
**Pierre Teilhard de Chardin**

### **Evolución de los sistemas antioxidantes e implicaciones en los mecanismos de daño neuronal**

El oxígeno es necesario para la vida pero, paradójicamente, su manejo puede resultar nocivo al organismo ya que como parte de su metabolismo se producen ERO, las cuales atacan diferentes blancos en las células (Andersen 2004). Las células han presentado adaptaciones que les permiten actuar contra el EO potenciando la producción de enzimas de defensa, incrementando la glucólisis y

la activación de genes que codifican factores de transcripción y proteínas estructurales (Sas *et al.* 2007); las defensas endógenas entonces han evolucionado para prevenir la excesiva oxidación de los sistemas biológicos (Cemeli *et al.* 2009).

Un antioxidante es cualquier agente capaz de prevenir la oxidación. Es probable que los primeros antioxidantes hayan sido simples barreras físicas: la compartimentalización de los componentes celulares vulnerables pudieron servir como protección contra la producción y efecto de las ERO (Benzie 2000).

Al ocurrir la transferencia electrónica hacia el oxígeno paso a paso, las especies resultantes de este fenómeno son:  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , radical  $OH^{\bullet}$  y finalmente agua. Sin embargo en cada paso pueden darse otras reacciones y producirse especies que potencien el daño.

La unión a las formas inactivas de  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  previenen la degradación de peróxidos catalizada por iones metálicos y la producción de  $OH^{\bullet}$ . El primer mecanismo de unión a metales iónicos fue quizá llevado a cabo por el  $Cu^{2+}$  y el  $Fe^{2+}$  evitando la formación de  $OH^{\bullet}$  en sitios biológicos estratégicos, direccionando el daño hacia ellos mismos. Esta estrategia se volvió sumamente eficiente, pues requería de estructuras altamente especializadas, lo que resultó en la evolución de proteínas específicas. Las enzimas que remueven  $H_2O_2$  incluyen a las CATs y a las peroxidases que en su mayoría contienen un  $Fe^{3+}$  en su sitio activo. Lo anterior refleja la etapa evolutiva de este mecanismo de defensa. El  $Fe^{2+}$  se hizo metabólicamente disponible antes que el  $Cu^{2+}$ , otro de los principales metales usados durante las reacciones redox. La CAT está restringida casi exclusivamente a los peroxisomas. Otros organelos como la mitocondria y el cloroplasto usan peroxidases del tipo de la GPx, que contiene selenio en su sitio activo. La SOD es una enzima ampliamente distribuida en los sistemas vivos; contiene  $Fe^{2+}$  y manganeso y es estructuralmente homóloga (Benzie 2000).

Los principales mecanismos de defensa antioxidante en los sistemas vivos han tenido un papel crucial en la adaptación y supervivencia de muchos de los organismos actualmente conocidos. En el humano no ha sido la excepción, pero a pesar de que años de evolución nos han permitido contar con estrategias que atenúen el daño por mecanismos oxidantes, la cantidad de enfermedades asociadas con EO (y todas las alteraciones que este fenómeno conlleva), es frecuente. Tal es la razón por la cual se ha venido impulsando el desarrollo de tácticas que resulten en la efectiva producción de elementos antioxidantes que sean de fácil adquisición y suministro, ya que en los humanos, los mecanismos de defensa antioxidante están sumamente influenciados por la nutrición (Benzie 2000). Existe una tasa basal de daño oxidante a moléculas y componentes celulares, variando entre las personas la cantidad de blancos afectados debido, en parte, a las diferentes tasas de producción de ER, lo cual implica que el EO no se trata de un mecanismo fisiológico normal, sino de un proceso anormal por

deficiencias en los niveles de mecanismos de defensa antioxidante que difícilmente puede ser cuantificable (Halliwell 1999).

Como se ha venido señalando, la composición del sistema nervioso lo convierte en un objetivo muy susceptible al ataque por radicales libres y ER. Aunque generalmente se asocia el EO con mecanismos de neurodegeneración, el que se formen radicales libres no necesariamente conducirá a la degeneración neuronal, ni será la causa determinante de que el daño neuronal se desarrolle. Aunado a esto, se sabe que durante el envejecimiento ocurren una serie de cambios progresivos en la composición y funcionamiento del cerebro y, en ocasiones, dichas modificaciones se ven incrementadas dramáticamente cuando algún gen defectuoso interviene, como puede ser en el caso de EH. El envejecimiento puede ser un proceso central e importante en muchas enfermedades neurodegenerativas, no obstante, dicho postulado no es una regla pues en muchas de ellas existen casos juveniles, que si bien son raros, hay una alteración que va más allá de la pérdida de funcionalidad provocada por el paso del tiempo (Mattson & Magnus 2006). Es importante mencionar que mientras más senescente se encuentre una célula, mayor es la posibilidad de que presente algún evento de estrés, es decir, con el envejecimiento, las células se tornan más vulnerables. Las neuronas de los mamíferos se encuentran entre las células más longevas que puedan haber, pues viven tanto como nosotros lo hacemos (Yuan *et al.* 2003), otra razón por la que se cree que el sistema nervioso es especialmente frágil ante cualquier anomalía.

La evolución de los sistemas antioxidantes ha sido foco de atención en los últimos años, pues sólo entendiéndola se podrá llegar a una mejor planeación de estrategias que mejoren la calidad de vida de los humanos. Mientras eso ocurre, seguirán desarrollándose trabajos como éste donde queda claro que SAC y L-CAR han demostrado ejercer una efectiva actividad disminuyendo el daño neuronal evocado por reacciones oxidantes y deficiencias en el metabolismo energético de ratas. A pesar de que no es factible extrapolar en su totalidad los resultados de este trabajo con los rasgos asociados con la EH, sí se pueden usar para señalar a tales sustancias como efectivos agentes antioxidantes y proenergéticos.

*La ciencia debe entenderse como un fenómeno social,  
como una empresa valiente, humana, y no obra de robots  
programados para recoger información pura.  
Stephen Jay Gould*

## **11. IMPACTO SOCIAL**

La ciencia es una actividad enteramente social. Hecha por y para individuos pertenecientes a sus núcleos. Es el instrumento por excelencia que sirve para encarar y resolver problemas, en este caso, problemas de salud. Sin embargo, es la ciencia también quien divide a la humanidad en un primer y tercer mundo, mientras el primero inventa, decide y posee, el tercero adquiere y utiliza, de manera imponente, los inventos del primero.

Por lo anterior, es de gran importancia todo aquel conocimiento e innovación que sea generado por mexicanos, pues nuestro país pertenece al grupo de los tercermundistas y son justo tales elementos los que nos pueden poner en una situación más igualitaria con respecto a otras naciones y mejorar, de esta manera, nuestra calidad de vida.

La investigación básica brinda herramientas para que en un futuro los datos obtenidos de ella puedan ser aplicables y beneficiar a la población en cierto grado y en distintos aspectos. Esta tesis provee información importante que puede resultar en el posible diseño de fármacos que reduzcan o eliminen las alteraciones provocadas por la EH y por todos aquellos desórdenes neurodegenerativos en los que el EO desempeña un papel fundamental. Esto es de suma relevancia, pues las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en una de las principales preocupaciones a nivel mundial.

México también registra un rápido avance de las enfermedades de este corte y para hacer frente al reto que representan se debe cambiar el enfoque individual y concebirse como “padecimientos de familia y comunidad” por los altos costos económicos y sociales que generan. Este aumento tiene su origen en la transición epidemiológica y demográfica que vive el país. Mientras más se alarga la vida, mayor es el riesgo de padecerlas (Corona-Vázquez 2008). Según el Censo de Población y Vivienda realizado por el INEGI en 2005, en la población mexicana existe la tendencia al aumento de personas de la mediana y tercera edad durante las próximas décadas y son precisamente estos grupos quienes presentan una mayor predisposición a padecer disfunciones del sistema nervioso; de manera especial, la población que se encuentra por arriba de los 50 años, pues ahora las mujeres viven hasta los 77.4 años y los hombres hasta los 72.6 (Navarrete *et al.* 2000), lo que indica que los problemas de salud relacionados con el sistema nervioso serán prioritarios en el mediano plazo. La problemática se verá acentuada porque en el país los factores de riesgo se presentan en mayor grado debido a las desigualdades sociales y la falta de acceso a servicios de salud y

educación que permitan estar informados sobre las medidas de prevención o atenuación ante alguna enfermedad; según Navarrete y col. (2000), algunos de estos agentes son los hábitos de alimentación, el consumo de tabaco, alcohol y otras drogas, estados que llevan a una hiperlipidemia, hipertensión arterial, arritmias, enfermedades vasculares periféricas, insuficiencia cardiaca congestiva y diabetes mellitus. Todos ellos factores que incrementan el riesgo de que ocurran enfermedades cerebrovasculares que dan lugar a cambios degenerativos y demenciales.

Según el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se cree que en México existen alrededor de 8,000 personas con EH. Las estadísticas exactas son difíciles de obtener, no sólo porque en nuestro país no se cuenta con la infraestructura para llevar a cabo censos en este tipo de enfermedades, sino porque la enfermedad es difícil de diagnosticar y muchas personas optan por no tratar a sus familiares: La EH es hereditaria, catalogada como una enfermedad mental, como locura, como algo vergonzoso que es preferible mantener escondido, al grado de llegar a negar su existencia por generaciones; incluso se llega a pensar que se trata de un acontecimiento esotérico y no se investiga nada sobre ella, y mucho menos se trata.

Esto lleva a que nosotros, los científicos, nos veamos ante la imperiosa necesidad de no soslayar las exigencias y necesidades de la gente en materia de salud. Se requiere que el sector creativo desarrolle técnicas que permitan el diagnóstico apropiado, congruente y de alto impacto, así como estrategias para mejorar la calidad de vida de los afectados y, que todo esto, esté al alcance de un gran sector poblacional. Sin duda alguna, los resultados aquí presentados forman los cimientos que más adelante permitirán la elaboración de planes y herramientas que puedan aplicarse a la clínica.

Por último, es importante resaltar que si un pueblo carece de algún bien material que pueda ser cuantificable o tasado como es el alimento, el agua, el vestido o el dinero mismo, le será fácil detectarlo, podrá hacerlo con toda exactitud; en cambio, si le falta ciencia, es poco probable que pueda percatarse, y más en México, pues vivimos en un país donde la ciencia es una actividad elitista, ajena al común de la población, donde todo se queda en el plano de lo intelectual y es sólo una pequeña fracción lo que se proyecta a la vida cotidiana.

Todo esto deja claro que una de las labores más importantes que tenemos como científicos es difundir el conocimiento, hacer ver al común de la gente, que gracias a trabajos como el aquí expuesto pueden mejorar su calidad de vida de manera directa e indirecta. En este caso particular podría llegar a reflejarse en algo medible, como el diseño de medicamentos, pero finalmente el conocimiento impulsa la vida de las sociedades hacia el progreso, nos hace grandes, nos hace libres.

*¡Sólo un momento de bienaventuranza!  
Pero, ¿acaso es eso poco para toda una vida humana?  
Fiodor M. Dostoievski*

## 12. CONCLUSIONES

- ◆ Pudo comprobarse que en términos de disfuncionalidad mitocondrial y daño a los lípidos de membrana, tanto la administración intraestriatal única de QUIN o 3-NP en ratas imita los procesos que ocurren durante la neurodegeneración de Huntington.
- ◆ A tiempos cortos (4 horas) y medios (7 días) la L-CAR actúa eficazmente restableciendo algunas funciones neuronales que se ven afectadas por el EO resultado de la actividad tóxica del QUIN y el 3-NP: reduce la conducta rotacional y restablece la funcionalidad de la mitocondria, por un lado; por otro, impide que las especies reactivas continúen con el deterioro de los componentes membranales (lípidos, principalmente).
- ◆ En las pruebas realizadas 4 horas después de la lesión tóxica, la recuperación de las funciones celulares no resulta tan obvia, aunque L-CAR previno la PL aún por debajo de las condiciones control, no fue capaz de restaurar la actividad mitocondrial. En cambio, bajo el tratamiento subcrónico (7 días) cumplió muy bien su acción de rescate funcional.
- ◆ SAC demostró poseer sólo un papel protector parcial, a pesar de disminuir drásticamente la conducta de rotación a los 7 días, no se comportó de manera uniforme pues sólo impidió la peroxidación lipídica ante la toxicidad del 3-NP. Falta por confirmar su participación en la restauración de la función mitocondrial.

**L-carnitina y S-alilcisteína demostraron su capacidad como agentes neuroprotectores ejerciendo funciones de rescate en los dos modelos tóxicos: ácido quinolínico y ácido 3-nitropropiónico, mismos que semejan características de la patología de Huntington, mostrando una efectividad superior la L-CAR con respecto a SAC. A pesar de que los dos agentes pueden considerarse como antioxidantes típicos, su protección diferencial podría sustentar su actuación. Los resultados obtenidos en ambos casos proveen herramientas prometedoras en el diseño de terapias farmacológicas. Es imperante que se haga una caracterización más profunda para tener mayor certeza de cómo desempeñan sus acciones para rescatar la integridad física y funcional del tejido nervioso.**

*¡Finalizado! Estúpida palabra. ¿Por qué "finalizado"?*  
*¡Finalizado y la nada absoluta son la misma cosa! (...)*  
*Vale lo mismo que si no hubiera existido.*  
*Johann W. Goethe*

### 13. PERSPECTIVAS

- ✧ Diseñar protocolos *in vivo* bajo esquemas de administración agudos que permitan obtener resultados sobre la manera en la que se comporta el derivado del EAE: la SAC. De esta forma se podrá determinar si abarca más aspectos de neuroprotección.
- ✧ Investigar cómo es que los compuestos antioxidantes L-CAR y SAC son capaces de llevar a cabo su acción restauradora en términos de funcionalidad, es decir, conocer su modo de acción a nivel molecular a través de la determinación de su estructura proteica y el reconocimiento de sus sitios activos; o bien, determinar si hay vías de señalización en las que participen o si impulsan la activación de alguna de ellas.
- ✧ Investigar qué otro tipo de efectos positivos pueden tener tanto la L-CAR como la SAC al enfrentarse a un proceso iniciado de daño neuronal, ya sea a través de la cuantificación de genes y proteínas asociadas a eventos de muerte, supervivencia y/o proliferación celular; midiendo si disminuye el daño al DNA o cuantificando si promueven el restablecimiento de la actividad energética de las neuronas.
- ✧ Implementar estos agentes antioxidantes (también como postratamiento) en diseños experimentales más largos, así como en otro tipo de modelos que semejen la EH (pueden ser los transgénicos, donde sí se presenta la aberración cromosómica) u otros trastornos neurodegenerativos cuya característica trascendental sea el daño causado por EO. Caracterizar la actividad de las sustancias, el efecto que tienen y el modo de acción.
- ✧ A través de la información que pudiera brindar el conocimiento de los mecanismos de acción de las sustancias empleadas en este trabajo, se podrá esclarecer mejor el progreso de diferentes trastornos neurodegenerativos, en especial de la EH, y también la evolución de mecanismos endógenos de protección contra daño oxidante.



## 14. GLOSARIO

**ANOVA.** El análisis de varianza (ANOVA) es un método estadístico usado para poner a prueba la igualdad de dos o más medidas poblacionales; es una extensión o generalización de la prueba de *t* para dos muestras, aplicable a más de dos muestras independientes (Weimer 2006).

**ANOVA de una vía.** Es una metodología para analizar la variación entre muestras y la variación al interior de las mismas varianzas, en lugar de rangos. Es útil para comparar dos o más medidas poblacionales (Weimer 2006).

**Apomorfin.** Potente agonista de los receptores dopaminérgicos (se une a los dominios D1 y D2); es capaz de estimular las terminaciones postsinápticas de las neuronas dopaminérgicas estriatales (Li, *et al.* 2006).

**Autócrina.** Tipo de comunicación celular donde los mensajeros químicos producidos por una célula interactúan con los receptores de células de la misma estirpe para ejercer su efecto (Gottfried-Blackmore 2000).

**Alostérico.** Proteínas cuyos cambios de conformación acoplan dos lugares de unión separados de su molécula, distintos al sitio en el que ejerce normalmente su efecto una determinada sustancia endógena. Han sido seleccionadas a través de la evolución, ya que permiten a la célula relacionar la presencia de una molécula con la presencia o ausencia de cualquier otra molécula (Alberts *et al.* 2002).

**Basófilos.** Tipo de células que integran el sistema inmune; se trata de un tipo de glóbulos blancos o linfocitos. Juegan un papel importante en mecanismos de inflamación, particularmente en respuestas alérgicas (Albers *et al.* 2002).

**Conductancia.** Es una medida de la facilidad con la cual un conductor transfiere una corriente eléctrica, se mide en siemens (S) (Randall *et al.* 2002).

**Densidad postsináptica.** Especialización fibrosa del citoesqueleto, de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , localizada bajo la membrana postsináptica en las sinapsis del SNC; especialmente asociada con las sinapsis glutamatérgicas. Compuesta por diferentes agentes proteicos como receptores glutamatérgicos, moléculas de adhesión y otras proteínas de señalización. Todas éstas están relacionadas con la regulación de la transmisión sináptica (Kennedy 1997).

**Eferencia.** Axón que conduce información desde el SNC hacia la periferia (Randall *et al.* 2002).

**Fascículos.** Agregación de prolongaciones neuronales para formar un haz nervioso (Purves *et al.* 2007).

**Ipsilateral.** Relacionado con el mismo lado del cuerpo (www.cancer.gov).

**Mastocitos.** Células que forman parte del sistema inmune, contienen gránulos ricos en histamina y heparina; median reacciones de alergia, anafilaxias y defensa contra patógenos. Son originados en la médula ósea y están presentes en la mayoría de los tejidos, cerca de los vasos sanguíneos (Albers *et al.* 2002).

**Parácrina.** Nivel de comunicación en el cual las células secretan mensajeros químicos que ejercen efectos sobre células que están en su cercanía, pero de diferente estirpe (Gottfried-Blackmore 2000).

**Potencial de acción.** También llamado impulso nervioso. Proceso que llevan a cabo las células excitables en el cual sobrerreaccionan a un estímulo eléctrico pequeño; es capaz de regenerarse y es conducido a través de los axones de manera unidireccional. El fenómeno se da gracias a que estas células tienen canales sensibles a voltaje; si se estimulan los de  $\text{Na}^+$  ocurre una despolarización porque el potencial de reposo se hace más positivo; en cambio, si estimulan los de  $\text{K}^+$  ocurre una repolarización (la célula vuelve al estado de reposo) o una hiperpolarización: el potencial de reposo se hace más negativo. Para que se produzca esta respuesta de todo o nada, el estímulo debe rebasar el potencial umbral, de esta manera la respuesta se dispara hasta que llega a cierto voltaje y entonces se cierran los canales responsables de la excitación de la célula, abriéndose los que la devuelven a su estado de reposo (Randall *et al.* 2002).

**Potencial de equilibrio:** diferencia de voltaje a través de una membrana semipermeable en el equilibrio de un ión, es decir, cuando no hay flujo neto del mismo (Randall *et al.* 2002).

**Potencial de membrana o de reposo.** Es una medida del potencial eléctrico relativo de una célula con respecto al fluido extracelular, que por convención debe ser considerado como cero; es la diferencia de potencial a través de la membrana, es decir, la medida de la diferencia de la concentración iónica dentro y fuera de la célula. Siempre es negativo y se debe al gradiente electroquímico que se establece en el estado sostenido (Randall *et al.* 2002).

**Potencial reverso.** Potencial de membrana en el cual no hay flujo de corriente a través de los canales insertados en la membrana a pesar de que estos se

encuentren abiertos; el valor del potencial reverso ayuda a establecer qué iones son los responsables del cambio de voltaje durante las sinapsis, mientras más cercano al valor del *potencial de equilibrio* del ión, significa que su canal permaneció abierto durante el evento (Randall *et al.* 2002).

**Potencial sináptico.** Tipo de señal eléctrica que se asocia con la comunicación entre las neuronas durante la sinapsis eléctrica (Purves *et al.* 2007).

**Prueba de Kruskal-Wallis.** Resulta útil cuando no se puede satisfacer el supuesto de normalidad subyacente en ANOVA de una vía. Es un método no paramétrico útil para poner a prueba una hipótesis nula relativa a que  $k$  muestras independientes provienen de poblaciones continuas idénticas. Es una generalización de la prueba de la suma de los rangos (Weimer 2006).

**Prueba de Tukey.** Prueba estadística de comparación múltiple usada de manera conjunta con el ANOVA; es usada para encontrar medias significativamente diferentes una de otra (Weimer 2006).

**Sitio de relevo.** Núcleos por los cuales pasa una vía destinada a terminar en otro lugar (generalmente la corteza); estructuras que filtran información o hacen un pre-procesamiento de alguna función especial (Kandel *et al.* 2000).

**Tónica.** Actividad sostenida en respuesta a un estímulo en curso; opuesto a fásico (Purves *et al.* 2007).

**Uniones tipo gap.** Median la comunicación intercelular al permitir el paso de iones inorgánicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles entre los respectivos citoplasmas, acoplando a las células tanto eléctrica como metabólicamente. Están organizadas con base en proteínas transmembranales denominadas conexones. Cuando los conexones de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes se encuentran alineados forman un canal acuoso continuo que conecta ambos citoplasmas (Alberts *et al.* 2002).

## 15. PUBLICACIONES

Los resultados presentados en el presente trabajo se sustentan y han sido avalados por otros expertos del área, resultando en dos publicaciones en revistas prestigiadas. Una de ellas aborda los resultados obtenidos con el antioxidante *S*-alilcisteína y la otra, incluye aquellos que se obtuvieron al emplear L-carnitina. En ambos documentos se complementan los resultados obtenido *in vivo* (mostrados en esta tesis) con los llevados a cabo *in vitro* por Diana Elinos-Calderón.

1. Elinos-Calderón D\*, Robledo-Arratia Y\*, Pérez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverrí J, Ali SF, Santamaría A. **2009**. *Early nerve ending rescue from oxidative damage and energy failure by L-carnitine as post-treatment in two neurotoxic models in rat: recovery of antioxidant and reductive capacities*. Exp Brain Res. 197(3): 287-96.
2. Elinos-Calderón D\*, Robledo-Arratia Y\*, Pérez-De La Cruz V, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. **2010**. *Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine*. J Neural Transm. 117: 35-44.

---

\* Ambas autoras contribuyeron equitativamente a la realización de estos trabajos.

## 16. REFERENCIAS

- Abuja PM and R Albertini. **2001**. *Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance in lipoproteins*. Clin Chim Acta. 306(1-2): 1-17.
- Alberts B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts and JD Watson. **2002**. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1387 pp.
- Alexi T, PE Hughes, RL Faull, CE Williams. **1998**. *3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration*. Neuroreport. 9: R57-R64.
- Andersen JK. **2004**. *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nature Rev Neurosc. 5(7): S18-S25.
- Balaseshthil S, S Arivazhagan, CR Ramachandran, S Nagini. **1999**. *Effects of Garlic on 7,12-Dimethylbenz[a] anthracene-Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis*. Cancer Det Prev. 23: 534-538.
- Bazzett TJ, RC Falik, JB Becker and RL Albin. **1996a**. *Chronic intrastriatal administration of quinolinic acid produces transient nocturnal hypermobility in the rat*. Brain Res Bull. 39(2): 69-73.
- Bazzett TJ, RC Falik, JB Becker and RL Albin. **1996b**. *Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentration of quinolinic acid and malonate in rat striatum*. Brain Res. 718: 228-232.
- Beal MF, E Brouillet, BG Jenkins, RJ Ferrante, NW Kowall, JM Miller, E Storey, R Srivastava, BR Rosen and BT Hyman. **1993**. *Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-Nitropropionic acid*. J Neurosc. 13(10): 4181-4192.
- Beal MF and RJ Ferrante. **2004**. *Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease*. Nature Rev Neurosc. 5(5): 373-384.
- Belman, S. **1985**. *Inhibition of Soybean Lipoxygenase by Onion and Garlic Oil Constituents*. Proc Am Assoc Cancer Res. 26: 131.
- Benzie IFF. **2000**. *Evolution of antioxidant defense mechanisms*. Eur J Nutr. 39: 53-61.
- Bertram L and RE Tanzi. **2006**. *Genetics of Neurodegenerative Diseases*. In Siegel GJ, RW Albers, ST Brady and DL Price. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Seventh edition. Elsevier Academic Press. Oxford, UK. pp. 653-666.
- Binienda ZK and SF Ali. **2001**. *Neuroprotective role of image-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity*. Toxicol Lett. 125(1-3): 67-73.
- Block E, R Iyer, S Grisoni, C Saha, S Belman, FP Lossing. **1988**. *Lipoxygenase Inhibitors from the Essential Oil of Garlic. Markovnikov Addition of the Allyldithio Radical to Olefins*. J Am Chem Soc. 110: 7813-7827.
- Boeck CR, M Ganzella, A Lottermann and D Vendite. **2004**. *NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice*. Epilepsia. 45(7): 745-750.
- Boehning D, RL Patterson, L Sedaghat, NO Glebova, T Kurosaki and SH Snyder. **2003**. *Cytocrome c binds to inositol (1,4,5) triphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis*. Nat Cell Biol. 5(12): 1051-1061.
- Bonsi A, D Cuomo, G Martella, G Sciamanna, M Tolu, P Calabresi, G Bernardi and A Pisani. **2006**. *Mitochondrial toxins in basal ganglia disorders: from animal models to therapeutic strategies*. Curr Neuropharmacol. 4: 69-75.
- Borek C. **2001**. *Antioxidant health effects of aged garlic extract*. J Nutr. 131(3s): 1010S-1015S. Review.

- Borlongan CV, TV Koutouzis, TB Freeman, DW Cahill and PR Sanberg. **1995.** *Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motor symptoms of Huntington's disease.* Brain Res. 697: 254-257.
- Borlongan CV, TK Koutouzis and PR Sanberg. **1997.** *3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease.* Neurosc and Biobehav Rev. 21(3): 289-293.
- Brouillet E, BG Jenkins, BT Hyman, RJ Ferrante, NW Kowall, R Sriastava, DS Roy, BR Rosen and MF Beal. **1993.** *Age-Dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-Nitropropionic acid.* J Neurochem. 60(1): 356-359.
- Brouillet E, F Condé, MF Beal and P Hantraye. **1999.** *Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals.* Prog in Neurobiol. 59: 427-468.
- Brouillet E, C Jacquard, N Bizat and D Blum. **2005.** *3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease.* J Neurochem. 95:1521-1540.
- Browne SE, RJ Ferrante and MF Beal. **1999.** *Oxidative stress in Huntington's disease.* Brain Path. 9: 147-163.
- Browne SE and MF Beal. **2004.** *The energetics of Huntington disease.* Neurochem Res. 29(3): 531-546.
- Bueno R, RR de Sotomayor, C Pérez-Guerrero, L Gomez-Amores, CM Vázquez, MD Herrera. **2005.** *L-carnitine and propionyl-L-carnitine improve endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: different participation of NO and COX-products.* Life Sci. 77: 2082-2097.
- Carter RJ, LA Lione, T Humby, L Mangiarini, A Mahal, GP Bates, SB Dunnett and AJ Morton. **1999.** *Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation.* J Neurosci. 19: 3248-3257.
- Cemeli E, A Baumgartner and D Anderson. **2009.** *Antioxidants and the comet assay.* Mutat Res. 681(1): 51-67.
- Corona-Vázquez T. **2008.** La Crónica de Hoy. Figueroa A. *Registra México rápido avance de males neurodegenerativos.* [En línea] [http://www.cronica.com.mx/nota.php?id\\_nota=352231](http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_nota=352231); consultada el 12 de septiembre de 2009.
- Coyle JT and P Puttfarcken. **1993.** *Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders.* Science. 262(5134): 689-695.
- Davies SW and E Scherzinger. **1997.** *Nuclear inclusions in Huntington's disease.* Trends Cell Biol. 7(11): 422.
- Demaurex N and L Scorrano. **2009.** *Reactive oxygen species are NOXious for neurons.* Nature Neurosc. 12(7): 819-821.
- Descriptores en Ciencias de la Salud. *Descriptor – Sinaptosomas.* [En línea] <http://decs.es/anatomia/sinaptosomas>; consultada el 3 de septiembre de 2009.
- Dotan Y, D Lichtenberg and I Pinchuk. **2004.** *Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress.* Prog Lipid Res. 43: 200-227.
- Fang FC. **2004.** *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.* Nature Rev Microbiol. 2(10): 820-832.
- Fink SL, DY Ho and RM Sapolsky. **1996.** *Energy and glutamate dependency of 3-nitropropionic acid neurotoxicity in culture.* Exp Nerol. 138: 298-304.
- Furuno T; T Kanno, K Arita, M Asami, T Utsumi, Y Doi, M Inoue and K Utsumi. **2001.** *Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition.* Biochem Pharmacol. 62: 1037-1046.

- García M, P Vanhoutte, C Pages, MJ Besson, E Brouillet and J Caboche. **2002.** *The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module.* J Neurosci. 22(6): 2174- 2184.
- Giorgini F, P Guidetti, QV Nguyen, SC Bennett & PJ Muchowski. **2005.** *A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease.* Nat Gen. 37: 526-531.
- Goldberg YP, MA Kalchman, M Metzler, J Nasir, J Zeisler, R Graham, HB Koide, J O'Kusky, AH Sharp, CA Ross, F Jirik and MR Hayden. **1996.** *Absence of disease phenotype and intergenerational stability of the CAG repeat in transgenic mice expressing the human Huntington disease transcript.* Hum Mol Gen. 5: 177-185.
- González-Cortés C and A Santamaría. **2007.** *Quinolinic acid, Huntington's disease and inflammatory events in the brain.* In Santamaría A and ME Jiménez-Capdeville. *New perspectives in brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies.* Research Signpost. Kerala, India. pp. 37-62.
- Gottfried-Blackmore AC. **2000.** *Caracterización funcional del receptor 1b-adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 97 pp.
- Gould DH, DLGustine. **1982.** *Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid.* Neuropathol Appl Neurobiol. 8(5): 377-393.
- Gray EG and VP Whittaker. **1962.** *The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation.* J Anat. 96: 79-88.
- Greene JG, SS Sheu, RA Gross and JT Greenamyres. **1998.** *3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms.* Neurosci. 84(2): 503-510.
- Grossman LI, TR Schmidt, DE Wildman and M Goodman. **2000.** *Molecular evolution of aerobic metabolism in primates.* Mol Phylogen & Evol. 18(1): 26-36.
- Grossman LI, DE Wildman, TR Schmidt and M Goodman. **2004.** *Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates.* Trend Gen. 20(11): 578-585.
- Guidetti P, RE Luthi-Carter, SH Augoog and R Schwarcz. **2004.** *Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntinton's disease.* Neurobiol Dis. 17: 455-461.
- Guidetti P, GP Bates, RK Graham, MR Hyden, BR Leavitt, ME MacDonald, EJ Slow, VC Wheeler, B Woodman and R Schwarcz. **2006.** *Elevated brain 3-hydroxyhynurenine and quinolinate levels in Huntington's disease mice.* Neurobiol Dis. 23: 190-197.
- Gülçin I. **2006.** *Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine.* Life Sci. 78: 803-811.
- Gusella JF, NS Wexler, PM Conneally, SL Naylor, MA Anderson, RE Tanzi, PC Watkins, K Ottina, MR Wallace, AY Sakaguchi, AB Young, I Shoulson, E Bonilla and JB Martin. **1983.** *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease.* Nature. 306(5940): 234-238.
- Guyot MC, P Hantraye, R Dolan, S Palfi, M Mazière and E Brouillet. **1997.** *Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid.* Neurosci. 79(1): 45-56.
- Halliwell B. **1992.** *Reactive oxygen species and the central nervous system.* J Neurochem. 59(5): 1609-1623.
- Halliwell B. **1999.** *Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning).* Free Rad Res. 3: 261-272.
- Halliwell B. **2006.** *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* J Neurochem. 97: 1634-1658.

- Haripriya D, P Sangeetha, A Kanchana, M Balu and C Panneerselvam. **2005.** *Modulation of age-associated oxidative DNA damage in rat brain cerebral cortex, striatum and hippocampus by L-carnitine.* Exp Gerontol. 40: 129-135.
- Hart PE and AHV Schapira. **1999.** *Mitochondria: aspect of neuroprotection.* Drug Develop Res. 46: 57-66.
- Harwood SM, MM Yaqoob and DA Allen. **2005.** *Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis.* Ann Clin Biochem 42: 415-431.
- Hassel B and R Dingledine. **2006.** *Glutamate.* In Siegel GJ, RW Albers, ST Brady and DL Prince. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Seventh edition. Elsevier Academic Press. Oxford, UK. pp. 267-269.
- Hebb CO and VP Whittaker. **1958.** *Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase.* J Physiol. 142: 187-196.
- Herrera-Mundo MN, D Silva-Adaya, PD Maldonado, S Galván-Arzate, L Andrés-Martínez, V Pérez de la Cruz, J Pedraza-Chaverrí and A Santamaría. **2006.** *S-Allylcysteine prevent the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction.* Neurosci Res. 56: 39-44.
- Heyes MP, K Saito, JS Crowley, LE Davis, MA Demitrack, M Der, LA Dilling, J Elia, MJP Kruesi, A Lackner, SA Larsen, K Lee, HL Leonard, SP Markey, A Martin, S Milstein, MM Mouradian, MR Panzattelli, BJ Quearry, A Salazar, M Smith, SE Strauss, T Sunderland, SW Swedo and WW Tourtellotte. **1992.** *Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease.* Brain. 115: 1249-1273.
- Heyes MP, CY Chen, EO Major and K Saito. **1997.** *Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types.* J Biochem. 326: 351-356.
- Hickey MA and AJ Morton. **2000.** *Mice ytransgenic for the Huntington's disease mutation are resistant to chronic 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity.* J Neurochem. 75(5): 2163-2171.
- Ho SE, N Ide and BHS Lau. **2001.** *S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process.* Phytomed. 8(1): 39-46.
- Holz RW and SK Fisher. **2006.** *Synaptic transmission and Cellular Signaling: An Overview.* In Siegel GJ, RW Albers, ST Brady and DL Prince. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Seventh edition. Elsevier Academic Press. Oxford, UK. pp. 167-183.
- Huang L, G Sun, D Cobessi, A Wang, J Shen, EY Tung, VE Anderson and EA Berry. **2005.** *3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic-base arginine in the active site of the enzyme.* Am Soc Biochem Mol Bio. 1-19.
- Hurlbert MS, W Zhou, C Wasmeier, FG Kaddis, JC Hutton and CR Freed. **1999.** *Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes.* Diabetes. 48(3): 649-651.
- Ikonomidou C, V Stefovskaja and L Turski. **2000.** *Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonist.* PNAS. 97(23): 12885-12890.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). II Censo de Población y Vivienda 2005. *Síntesis de Resultados. Estados Unidos Mexicanos.* [En línea] <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=est&c=10419&pred=1>; consultada el 14 de julio de 2009.
- Jacquard C, Y Trioulier, F Cosker, C Escartin, N Bizat, P Hantraye, JM Cancela, G Bovento and E Brouillet. **2006.** *Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca<sup>2+</sup>] rises and neurodegeneration but not Ca<sup>2+</sup> entry during NMDA receptor activation.* FASEB J. 20(7): 1021-1023.



- Janero DR. **1990.** *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.* Free Rad Biol & Med. 9: 515-540.
- Jara-Prado A, A Ortega-Vázquez, L Martínez.Ruano, C Ríos and A Santamaría. **2003.** *Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition.* Neurotox Res. 5(4): 237-244.
- Kandel E, JH Schwartz and TM Jessell. **2000.** *Principles of Neural Sciences.* Fourth ed. McGraw-Hill. New York. pp. 1320.
- Kennedy MB. **1997.** *The postsynaptic density in glutamatergic synapses.* Trends Neurosci. 20: 264-268.
- Kim GW and PH Chan. **2002.** *Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid.* J Cereb Blood Flow Metab. 22: 798-809.
- Knott AB, G Perkins, R Schwarzenbacher and E Bossy-Wetzl. **2008.** *Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration.* Nat Rev Neurosci. 9(7): 505-518.
- Koutouzis TK, CV Borlongan, T Scorcia, I Creese, DH Cahill, TB Freeman and PR Sanberg. **1994.** *Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects in locomotor behavior.* Brain Res. 646: 242-246.
- Li A, H Guo, X Luo, J Sheng, S Yang, Y Yin, J Zhou and J Zhou. **2006.** *Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons.* FASEB J. 20(8): 1263- 1276.
- Linder ME and AG Gilman. **1992.** *G Proteins.* Scientific American. 267(1): 56-65.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr and RJ Randall. **1951.** *Protein measurement with the Folin phenon reagent.* J Biol Chem. 193(1): 265-275.
- Ludolph AC, F He, PS Spencer, J Hammerstad, M Sabri. **1991.** *3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin.* Can J Neurol Sci. 18: 492-498.
- Maldonado PD, D Barrera, ON Medina-Campos, R Hernández-Pando, ME Ibarra-Rubio and J Pedraza-Chaverri. **2003a.** *Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats.* Life Sci. 73: 2543-2556.
- Maldonado PD, D Barrera, I Rivero, R Mata, ON Medina-Campos, R Hernández-Pando and José Pedraza-Chaverri. **2003b.** *Antioxidant S-Allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage.* Free Rad Biol & Med. 35(3): 317-324.
- Mangiarini L, K Sathasivam, M Seller, B Cozens, A Harper, C Hetherington, M Lawton, Y Trottier, H Lehrach, SW Davies and GP Bates. **1996.** *Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice.* Cell. 87(3): 493-506.
- Martin LJ, NA Al-Abdula, AM Brambrink, JR Kirsch, FE Sieber and C Portera-Cailliau. **1998.** *Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis.* Brain Res Bull. 46(4): 281-309.
- Mattson MP. **2002.** *Huntington's disease. Accomplices to neuronal death.* Nature. 415(6870): 377-379.
- Mattson MP. **2006.** *Nitro-PDI incites toxic waste accumulation.* Nat Neurosci. 9: 865-867.
- Mattson MP and T Magnus. **2006.** *Ageing and neuronal vulnerability.* Nat Rev Neurosci. 7(4): 278-294.
- McCord JM. **2000.** *The evolution of free radicals and oxidative stress.* Am J Med. 108(8): 652-659.

- Medina-Campos ON, D Barrera, S Segoviano-Murillo, D Rocha, PD Maldonado, N Mendoza-Patiño, J Pedraza-Chaverri. **2007**. *S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity*. Food Chem Toxicol. 45(10): 2030-2039.
- Menalled LB and MF Chesselet. **2002**. *Mouse models of Huntington's disease*. Trends in Pharm Sci. 23 (1): 32-39.
- Miranda AF, MA Sutton, RJ Beninger, K Jhamandas, RJ Boegman. **1999**. *Quinolinic acid lesion of the nigrostriatal pathway: effect on turning behavior and protection by elevation on endogenous kynurenic acid in Rattus norvegicus*. Neurosc Lett. 262: 81-84.
- Munday R and CM Munday. **1999**. *Low Doses of Diallyl Disulfide, a Compound Derived from Garlic, Increase Tissue Activities of Quinone Reductase and Glutathione Transferase in the Gastrointestinal Tract of the Rat*. Nutr Cancer. 34: 42-48.
- Nasir J, SB Floresco, JR O'Kusky, VM Diewert, JM Richman, J Zeisler, A Borowski, JD Marth, AG Phillips and MR Hayden. **1995**. *Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes*. Cell. 81(5): 811-823.
- Nasr P, HI Gursahani, Z Pang, V Bondada, J Lee, RW Hadley and JW Geddes. **2003**. *Influence of cytosolic and mitochondrial  $Ca^{2+}$ , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid*. Neurochem Int. 43(2): 89-99.
- National Cancer Institute. *Dictionary of cancer online*; [http://www.cancer.gov/templates/db\\_alpha.aspx?lang=spanish&CdrID=44172](http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?lang=spanish&CdrID=44172); consultada el 29 de Julio de 2009.
- Navarrete E, O Prospéro, R Hudson y R Guevara. 2000. *Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia*. Gac Méd Méx. 136(6): 573-584.
- Nelson DL y MA Cox. **2005**. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1119 pp.
- Ordway JM, S Tallaksen-Greene, CA Gutekunst, EM Bernstein, JA Cearley, HW Wiener, LS Dure, R Lindsey, SM Hersch, RS Jope, RL Albin and PJ Detloff. **1997**. *Ectopically expressed cag repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse*. Cell. 91(6): 753-763.
- Ott M; V Gogvadze, S Orrenius. **2007**. *Mitochondria, oxidative stress and cell death*. Apoptosis. 12: 913-922.
- Pang Z and JW Geddes. **1997**. *Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis*. J Neurosc. 17(9): 3064-3073.
- Pang Z, V Bondada, T Sengoku, R Siman and J Geddes. **2003**. *Calpain facilitates the neuron death induced by 3-nitropropionic acid and contributes to the necrotic morphology*. J Neuropath Exp Neur. 62(6): 633-643.
- Patel M and BJ Day. **1999**. *Metalloporohyryn class of therapeutic catalytic antioxidants*. Trends Pharmacol Sci. 20(9): 359-364.
- Pawley AC, S Flesher, RJ Boegman, RJ Benigner and KH Jhamandas. **1996**. *Differential action of NMDA antagonist on cholinergic neurotoxicity produced by N-methyl-D-aspartate and quinolinic acid*. Brit J Pharmacol. 117: 1059-1064.
- Paxinos G and C Watson. **1998**. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fourth ed. Academic Press. San Diego. pp. 456.
- Perchellet JP, EM Perchellet, NL Abney, JA Zirnstein, S Belman. **1986**. *Effects of Garlic and Onion Oils on Glutathione Peroxidase Activity, the Ratio of Reduced/Oxidized Glutathione and Ornithine Decarboxylase Induction in Isolated Mouse Epidermal Cells Treated with Tumor Promoters*. Cancer Biochem Biophys. 8: 299-312.

- Pérez P, A Flores, A Santamaría, C Ríos and S Galván-Arzate. **1996.** *Changes in transition metal contents in rat brain regions after in vivo quinolinic intrastriatal administration.* Arch Med Res. 27(4): 449-452.
- Pérez-De La Cruz V, C González-Cortés, S Galván-Arzate, ON Medina-Campos, F Pérez-Severiano, SF Ali, J Pedraza-Chaverri and A Santamaría. **2005.** *Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III).* Neurosc. 135:463-474.
- Pérez-De La Cruz V, C González-Cortés, J Pedraza-Chaverri, PD Maldonado, L Andrés-Martínez and A Santamaría. **2006.** *Protective effect of s-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes.* Brain Res Bull. 68: 379-383.
- Pérez-De La Cruz V and A Santamaría. **2007.** *Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence.* Physiol Res. 56: 513-526.
- Pérez-De La Cruz V, M Konigsberg, J Pedraza-Chaverri, N Herrera-Mundo, M Díaz-Muñoz, J Morán, T Fortoul-van der Goes, A Rondán-Zárate, PD Maldonado, SF Ali and A Santamaría. **2008a.** *Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic/energetic deficit synergic model in rats.* Eur J Neurosc. 27: 1075-1085.
- Pérez-Severiano F, A Santamaría, J Pedraza-Chaverri, ON Medina Campos, C Ríos and J Segovia. **2004a.** *Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation.* Neuroch Res. 29(4): 729-733.
- Pérez-Severiano F, M Rodríguez-Pérez, J Pedraza Chaverri, PD Maldonado, ON Medina-Campos, Alma Ortiz-Plata, A Sánchez-García, P Aguilera and A Santamaría. **2004b.** *S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats.* Neurochem Int. 45:1175-1183.
- Pérez-Severiano F, R Salvatiera-Sánchez, M Rodríguez-Pérez, EY Cuevas-Martínez, J Guevara, D Limón, PD Maldonado, ON Medina-Campos, J Pedraza-Chaverri and A Santamaría. **2004c.** *S-Allylcysteine prevents amyloid- $\beta$  peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits.* Eur J Pharmacol. 489: 197-202.
- Portera-Cailliau C, JC Hedreen, DL Price and VE Koliatsos. **1995.** *Evidence of apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models.* J Neurosc. 15(5): 3775-3787.
- Pryor WA and SS Godber. **1991.** *Noninvasive measures of oxidative stress status in humans.* Free Rad Biol & Med. 10: 177-184.
- Purves D, GJ Augustine, D Fitzpatrick, WC Hall, AS Lamantia, JO McNamara and SM Williams. **2007.** *Neurociencia.* Tercera edición. Panamericana. Madrid. 856 pp.
- Randall D, W Burggren and K French. **2002.** *Eckert. Animal Physiology: mechanisms and adaptations.* Fifth edition. W.H. Freeman and Company. New York. pp. 736.
- Reddy PH, M Williams and DA Tagle. **1999.** *Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease.* Trends Neurosc. 22(6): 248-255.
- Reynolds Jr. NC, W Lin, C Meyer Cameron and DL Roering. **1997.** *Differential responses of extracellular GABA to intrastriatal perfusions of 3-nitropropionic acid and quinolinic acid in the rat.* Brain Res. 778: 140-149.
- Ross CA and DW Cleveland. **2006.** *Intercellular miscommunication in polyglutamine pathogenesis.* Nat Neurosci. 9: 1205-1206.
- Santamaría A, ME Jiménez-Capdeville, A Camacho, E Rodríguez-Martínez, A Flores and S Galván-Arzate. **2001.** *In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum.* NeuroReport. 12(12): 2396-2396.

- Santamaría A, R Salvatierra-Sánchez, B Vázquez-Román, D Santiago-López, J Villena-Hernández, S Galván-Arzate, ME Gimes-Capdeville and SF Ali. **2003**. *Protective effects of the antioxidant selenium of quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies*. J Neurochem. 86:479-488.
- Santamaría A and E Jiménez. **2005**. *Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview*. Curr Top Neurochem. 4:1-20.
- Santamaría A, B Vázquez-Román, V Pérez-De La Cruz, C González-Cortés, MC Trejo-Solís, S Galván-Arzate, A Jara-Prado, J Guevara-Fonseca and SF Ali. **2005**. *Selenium reduces the proapoptotic signaling associated to NF- $\kappa$ B pathway and stimulates glutathione peroxidase activity during excitotoxic damage produced by quinolinate in rat corpus striatum*. Synapse. 58:258-266.
- Sapko MT, P Guidetti, P Yu, GA Tagle, R Pellicciari and R Schwarcz. **2006**. *Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate: implications for Huntington's disease*. Exp Neurol. 197: 31-40.
- Sas K, H Robotka, J Toldi and L Vécsei. **2007**. *Mitochondrial, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders*. J Neurol Sci. 257: 221-239.
- Sayre LM, G Perry and MA Smith. **2007**. *Oxidative stress and neurotoxicity*. Chem Res Toxicol. 21: 172-188.
- Scandalios JG. **2002**. *Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us?* Genome Biol. 3(7): 10191-10196.
- Schocke MFH, R Waldner, Z Puschban, C Kolbitsch, K Seppi, C Scherfler, C Kremser, F Zschiegner, S Felber, W Poewe and GK Wenning. **2000**. *In vivo magnetic resonance imaging embryonic neural grafts in a rat model of striatonigral degeneration (multiple system atrophy)*. NeuroImage. 12: 209-218.
- Schuck PF, A Tonin, G da Costa Ferreira, R Borba Rosa, A Latini, F Balaestro, ML Santos Perry, CL Duval Wannamacher, AT de Souza Wyse and M Wajner. **2007**. *In vitro effect of quinolinic on energy metabolism in brain of young rats*. Neurosc Res. 57: 277-288.
- Schwarcz R and C Köhler. **1980**. *Evidence against an exclusive role of glutamate in kainic acid neurotoxicity*. Neurosc Lett. 19: 243-249.
- Schwarcz R and C Köhler. **1983**. *Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid*. Neurosc Lett. 38: 85-90.
- Schwarcz R, WO Whetsell and RM Mangano. **1983**. *Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain*. Science. 219(4582): 316-318.
- Shear DA, J Dong, CD Gundy, KL Haik-Creguer and GL Dunbar. **1998**. *Comparison of intrastratial injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animals models of Huntington's disease*. Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat. 22: 1217-1240.
- Shih AY, S Imbeault, V Barakauskas, H Erb, L Jiang, P Li and TH Murphy. **2005**. *Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo*. J Biol Chem. 280(24): 22925-22936.
- Silva-Adaya D, V Pérez-De La Cruz, MN Herrera-Mundo, K Mendoza-Macedo, J Villena-Hernández, Z Binienda SF Ali and A Santamaría. **2008**. *Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine*. J Neurochem. 105:677-689.
- Sima AAF. **2007**. *Acetyl-L-carnitine in diabetic polyneuropathy. Experimental and clinical data*. CNS Drugs. 21(1): 13-23.
- Smith AJ, TW Sone and RA Smith. **2008**. *Preconditioning with NMDA protects against toxicity of 3-nitropropionic acid or glutamate in cultured cerebellar granule neurons*. Neurosc Lett. 440: 294-298.

- Stone T. **2001.** *Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance.* Prog Neurobiol. 64: 185-218.
- Thompson M and M Ali. **2003.** *Garlic [Allium sativum]: A Review of its Potential Use as an Anti-Cancer Agent.* Curr Cancer Drug Targets. 3: 67-8.
- Turrens JF. **2003.** *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* J Physiol. 552(2): 335-344.
- Uribe-Mutis CJ. **1998.** *Quimio-receptores y mecanismos de transmembrana.* MedUNAB. 1(2): 106-114.
- Vorobyov V and F Sengpiel. **2008.** *Apomorphine-induced differences in cortical and striatal EEG and their glutamatergic mediation in 6-hydroxydopamine-treated rats.* Exp Brain Res. 191: 277-287.
- Waldner R, Z Puschban, C Scherfler, K Seppi, K Jellinger, W Poewe and GK Wenning. **2001.** *No functional effects of embryonic neuronal grafts of motor deficits in a 3-nitropropionic acid rat model of advanced striatonigral degeneration (multiple system atrophy).* Neurosc. 102(3): 581-592.
- Wang C, N Sadovova, HK Ali, HM Duhart, X Fu, X Zou, TA Patterson, ZK Binienda, A Virmani, MG Paule, W Slikker Jr and SF Ali. **2007.** *L-Carnitine protects neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal apoptosis in rat forebrain culture.* Neurosc. 144(1): 46-55.
- Weimer RC. **2006.** *Estadística.* Segunda ed. Compañía editorial continental. México. pp. 793.
- White JK, W Auerbach, MP Duyao, JP Vonsattel, JF Gusella, AL Joyner and ME MacDonald. **1997.** *Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion.* Nat Gen. 17(4): 404-410.
- Whittaker VP. 1959. *The isolation and characterization of acetylcholine-containing particles from brain.* J Biochem. 72: 694-706.
- Wichmann T and MR DeLong. **2006.** *Neurotransmitters and Disorders of the Basal Ganglia.* In Siegel GJ, RW Albers, ST Brady and DL Price. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Seventh edition. Elsevier Academic Press. Oxford, UK. pp. 761-779.
- Wolfensberger M, U Amsler, M Cuénod, AC Foster, WO Whetsell Jr. and R Schwarcz. **1983.** *Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue.* Neurosc Lett. 41: 247-252.
- Wüllner U, AB Young, JB Penney, MF Beal. **1994.** *3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum.* J Neurochem. 63: 1772-1781.
- Yuan J, M Lipinski and A Degterev. **2003.** *Diversity in the mechanisms of neuronal cell death.* Neuron. 40: 401-413.
- Zeitlin S, JP Liu, DL Chapman, VE Papaioannou and A Efstratiadis. **1995.** *Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue.* Nat Gen. 11(2): 155-163.