



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

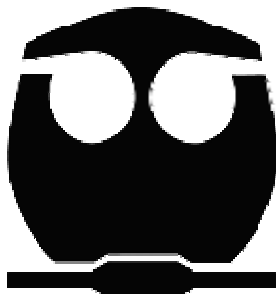
**CONTRIBUCIÓN DE LA NADPH OXIDASA SOBRE LA  
NEUROTOXICIDAD QUE SE INDUCE EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON:  
PAPEL PROTECTOR DE LA APOCININA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**PABLO DAVID DÍAZ PÉREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ**  
**VOCAL:**                 **Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**  
**SECRETARIO:**       **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**  
**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**  
**2º SUPLENTE:**       **Profesor: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL, INSTITUTO  
NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO  
SUÁREZ”**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

**SUSTENTANTE:**

**PABLO DAVID DÍAZ PÉREZ**

SE AGRADECE A LA **COMISIÓN COORDINADORA DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD Y HOSPITALES DE ALTA ESPECIALIDAD** POR LA BECA PROBEI (PROGRAMA DE BECAS DE INICIO A LA INVESTIGACIÓN) OTORGADA AL ALUMNO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

## **AGRADECIMIENTOS**

A ti mamá. Te admiro, te honro y te respeto. Gracias por darme la mejor herencia que pude recibir: instrucciones para seguir el Camino, la Verdad y la Vida. Aún cuando fuere viejo no las olvidaré. Te quiero mucho y sé que nos veremos pronto. Te extraño.

A mi padre. Gracias por tus consejos, enseñanzas y apoyo, los considero parte de vida.

A mis hermanas Melisa y Estefania por estar aquí en los tiempos buenos en los que reímos y en los tiempos malos en los que lloramos. Siempre firmes y luchando contracorriente, estoy orgulloso de ustedes. Nos falta mucho por aprender pero gracias a Dios lo hemos hecho bien hasta hoy. Las quiero.

A mis amigos y compañeros de milicia a los que admiro por pelear palmo a palmo la buena batalla en las universidades. A Vida Estudiantil DF y Xalapa: Hedilberto y Ale Peredo, Ale Mendoza, Luis Pomares y Liz, Gianina, Are Montes, Alex y Noemicita (fattys), Abraham Morales, Are (señora), Víctor Hugo Salas, Joram, Danielita (nena), Alex Cano, Adriana Salas, Adriana González, Mario Salas, Faby, Vero, Magic (Edgar), Iván, Juan, Ada, Mitzi, Germán, Heidy, Dan Barois, Fer Casiano y Nancy. A Aliento a los Huesos: Rebeca Jethzabel (gracias, en verdad estoy en deuda contigo), Daniela (Lupita), Joel, Andrea (Galletita), Miguel Arteaga y Esmeralda. A la CUR: Peter Dishman, Ruth Zuriely y Monche. A la congre Nueva Generación: Keila y Aby Betanzos, Iván Mendoza, Shealtiel y Marlen, A la familia Castillo, Norma, Áaron y Ara. A Ríos de Agua Viva: al

pastor Cristobal, Cristobal y Adriana, Telléliz y Toño, Alí y Lore. Dios me bendijo al ponerlos en mi vida.

A mis amigos de la Facultad de Química: Triana Marilin, Guadalupe Viguerras, Lilian y Fer (Lovenstein), Karina Hermoso, Ana Laura, Gustavo, Vanessa y Brenda, Marisol y Claudia, Emmanuel y Jenny, Nancy (mi mágica sensei), Fabiliciouz, Iraís, Jimena (jefa), Juan Carlos (amigo, camarada, compañero), Lilian Pavón, Cindy, Perla Guzmán, Víctor Santana.

A la doctora Perla. Gracias por su enorme apoyo, paciencia y enseñanza. Le agradezco por la oportunidad que me dio de participar con usted. Es una gran científica y una bella persona.

A mis maestros, a la Facultad de Química, a la UNAM. Estoy en deuda con ustedes y con mi nación.

A la mujer que se convirtió en mi mejor amiga. Gracias Emma Cecilia. Dios me ha enseñado tantas cosas a través de tu vida y mi oración es poder ser algo siempre nuevo y digno de ocupar un espacio en tu memoria que dure toda una vida. Gracias por tus palabras y por tus oraciones mientras estaba en la universidad y por las que hasta el día de hoy me regalas. Quiero estar a tu lado mucho tiempo. Te amo.

A Dios. Hubiera desmayado si no hubiera sabido que estabas aquí. Gracias por cambiar mi vida, por cambiar mi lamento en baile, por acompañarme en mi juventud y enseñarme a contar mis días de tal forma que ahora tengo contentamiento en mi corazón, eres lo mejor que me pudo haber pasado. Gracias por la Cruz.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Planteamiento del problema .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Objetivo.....</b>	<b>4</b>
Objetivo general .....	4
Objetivos particulares .....	5
<b>1.3. Hipótesis.....</b>	<b>5</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. La enfermedad de Huntington.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Ácido quinolínico .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. NADPH oxidasa .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4. Apocinina .....</b>	<b>25</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Materiales .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Animales.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. Diseño experimental .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4. Ensayo espectrofotométrico de fluorescencia para la     detección de <math>O_2^{\bullet-}</math> en homogenados de estriado de rata     .....</b>	<b>33</b>
<b>3.5. Ensayo para la cuantificación de peroxidación lipídica     .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6. Pruebas de conducta .....</b>	<b>35</b>

<b>3.7.</b> Análisis histológicos .....	36
<b>3.8.</b> Evaluación cuantitativa de las lesiones.....	36
<b>3.9.</b> Análisis estadístico .....	36
<b>4.</b> RESULTADOS.....	37
<b>4.1.</b> Detección de $O_2^{\bullet-}$ .....	37
<b>4.2.</b> Lipoperoxidación .....	40
<b>4.3.</b> Conducta rotatoria.....	41
<b>4.4.</b> Análisis histológico .....	42
<b>5.</b> ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
<b>6.</b> CONCLUSIONES .....	47
<b>7.</b> BIBLIOGRAFÍA .....	48



## ABREVIATURAS

APO	Apocinina
ATP	Adenosín trifosfato
CT	Control
DHE	Dihidroetidio
DPI	Cloruro de difenilen yodonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutíruco
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
His	Histidina
HOCl	Ácido hipocloroso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH ox	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NMDAr	Receptor al ácido N-metil-D-aspártico
NOX	<u>NADPH oxidasa</u>
·OH	Radical hidroxilo
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ion superóxido
phox	De los vocablos ingleses <i>phagocyte oxidase</i>
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PRR	Regiones ricas en prolina
QUIN	Ácido quinolínico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

## RESUMEN

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo autosómico dominante y fatal para el cual, aún no se cuenta con un tratamiento efectivo o cura.

Muchas de las características histológicas y bioquímicas de la enfermedad de Huntington pueden reproducirse de manera acertada por medio de la administración intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN) en ratas. El QUIN es un metabolito endógeno y agonista de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr), por lo que una exposición constante del QUIN a estos receptores genera una sobreactivación conocida como excitotoxicidad; la cual está asociada con un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, disminución de ATP y de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), pérdida específica de células GABAérgicas y colinérgicas, daño por estrés oxidante en la célula y finalmente muerte celular.

La participación de radicales libres y el consecuente estrés oxidante/nitrosante son parte del mecanismo neurotóxico del QUIN por lo que es importante conocer las fuentes de las especies reactivas de oxígeno (ERO) involucradas en el proceso de neurodegeneración. Una de las principales fuentes endógenas de radicales libres en la célula es la enzima NADPH oxidasa (NADPH ox) que se encarga de la producción del ión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), un precursor para otras ERO más oxidantes. Existe evidencia de que la sobreactivación de la NADPH ox interviene en la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, aunque no se sabe con exactitud los mecanismos por los cuales se activa. Debido a que el daño con QUIN se ha asociado a estrés oxidante y a que existe evidencia de la participación de la NADPH ox en otras enfermedades neurodegenerativas, en el presente trabajo se evaluó el efecto de un inhibidor de la NADPH oxidasa (apocinina; APO) sobre los cambios bioquímicos, morfológicos y conductuales que se inducen en un

modelo experimental de la enfermedad de Huntington. Los resultados muestran que la administración de APO (5 mg/kg i.p.) previene significativamente el daño neuronal y la conducta rotatoria (giros ipsilaterales) en los animales, cuando se administra 30 min antes y 60 min después de la administración intraestriatal de QUIN. Además, la administración de APO previno el incremento en los niveles de lipoperoxidación inducidos por el QUIN. Finalmente, el QUIN incremento significativamente la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en homogenados estriatales, la cual incremento aún más en presencia de NADH (sustrato de la NADPH ox). Estos resultados sugieren que la NADPH ox participa activamente en la generación de ERO, tras la sobreactivación de los NMDAr inducida por el QUIN. Se evaluaron otras posibles fuentes celulares de  $O_2^{\bullet-}$  y se observó que la xantina oxidasa, la sintasa de óxido nítrico y el complejo II mitocondrial no contribuyen significativamente a la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en el modelo con QUIN al tiempo en que se desarrollo el estudio (2 h). Estos resultados sugieren que la sobreactivación de la NADPH oxidasa podría estar participando en el desarrollo de la enfermedad de Huntington debido a una sobreproducción de  $O_2^{\bullet-}$ , que conlleva a la producción especies oxidantes más reactivas, resultando finalmente en la muerte neuronal. Los resultados obtenidos, también nos permiten proponer a la NADPH ox como un blanco terapéutico para el desarrollo de una terapia eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Planteamiento del problema**

Se ha demostrado que alteraciones en la estructura molecular y en la funcionalidad de las biomoléculas de células cerebrales en diversas enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad de Huntington están asociadas a la sobreproducción de ERO que generan estrés oxidante/nitrante celular, y que esto a su vez contribuye al daño celular asociado a las modificaciones en el comportamiento y a la pérdida de las capacidades cognitivas del paciente que sufre de esta enfermedad. En el modelo con QUIN un evento importante es el daño ocasionado por el estrés oxidante/nitrante, por lo que resulta de gran importancia el reconocer las fuentes de entidades reactivas de oxígeno que están involucradas en el estrés, a fin de conocer los mecanismos de daño y proveer las bases para el desarrollo de una terapia eficaz para el tratamiento de esta enfermedad. Por ello, en este trabajo se evaluó la participación del complejo enzimático NADPH oxidasa como una posible fuente de ERO en el modelo con QUIN ya que se ha observado que existe activación de esta enzima multimérica en otras enfermedades crónicas degenerativas.

## **1.2. Objetivo**

### **1.2.1. Objetivo general**

Evaluar la participación de la NADPH oxidasa en el daño producido por el estrés oxidante en el modelo con QUIN utilizando APO como inhibidor específico de la NADPH oxidasa.

### **1.2.2. Objetivos particulares**

Comprobar la contribución de la NADPH oxidasa en la generación de anión superóxido en el modelo con QUIN y evaluar el efecto de la APO sobre la actividad de la enzima.

Evaluar el efecto de la APO sobre las alteraciones conductuales producidas por la inyección de QUIN en el estriado de ratas.

Observar las modificaciones histológicas generadas por la administración de QUIN en estriado de ratas e investigar el efecto de la APO sobre estas modificaciones.

Evaluar el efecto de la APO en la generación de productos de lipoperoxidación generados por el QUIN.

### **1.3. Hipótesis**

Si la NADPH oxidasa está involucrada en la producción del anión superóxido en el modelo experimental con QUIN entonces la administración de un inhibidor específico de esta enzima como lo es la APO, prevendrá o atenuará el daño neuronal generado por el estrés oxidante inducido por la inyección de QUIN.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. La enfermedad de Huntington**

La enfermedad de Huntington es un desorden autosómico dominante, neurodegenerativo, progresivo, incurable y fatal que afecta de igual manera a hombres como a mujeres y se caracteriza por el movimiento anormal involuntario (corea, disquinesia y distonia) que semeja a posturas de baile; por esa razón, el nombre de esta enfermedad en sus inicios fue "corea de Huntington" ya que la raíz etimológica griega de "corea" es "baile". También se presentan dificultades en el habla (disartria). El progreso de las alteraciones motoras se puede dividir en tres etapas: la fase inicial se identifica por la existencia de movimientos involuntarios abruptos acompañados por temblor; en la segunda etapa el paciente no puede realizar movimientos coordinados por lo que la capacidad de realizar actividades cotidianas se ve limitada, se incluyen movimientos de los músculos de las extremidades, cabeza, cara y tronco; en esta fase también comienzan a declinar las funciones cognitivas y es notoria la pérdida de peso. Para la tercera y última etapa que es aproximadamente de 15 a 20 años después del inicio de la enfermedad, los movimientos coreicos son sustituidos por rigidez y bradiquinesia; la muerte del paciente ocurre en esta etapa (Harper, 1991).

La enfermedad de Huntington se manifiesta cuando el gen que codifica para la proteína huntingtina localizado en la región 4p16.3 en el brazo corto del cromosoma 4 muestra un incremento en el número de tripletes CAG (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). La huntingtina es una proteína muy grande que se ha conservado a través del tiempo en organismos vertebrados (Gissi *et al.*, 2006) y presenta una elongación en el sitio N-terminal del aminoácido glutamina

proveniente del triplete CAG que codifica para ese aminoácido, por lo que en determinada extensión anormal de CAG se genera la proteína mutada que resulta citotóxica para el tejido cerebral de los pacientes, especialmente para el ganglio basal y la corteza, dando origen a la sintomatología de la enfermedad que no sólo se manifiesta como desórdenes neurológicos, sino también en alteraciones en tejidos periféricos como disfunciones cardiacas, de músculo esquelético, endócrinas (páncreas, glándulas adrenales y tejido adiposo), anormalidades en tejido sanguíneo, entre otras (Sassone *et al.*, 2009). No se sabe con exactitud cómo es que la huntingtina mutada interacciona con las biomoléculas celulares pero se ha propuesto que la toxicidad adquirida por esta proteína está asociada a una ganancia y/o pérdida de función que involucra a toda la extensión de los residuos de glutamina y a los fragmentos cortos N-terminales producidos por la proteólisis llevada a cabo por diferentes proteasas como la calpaína (Gafni *et al.*, 2002; Gafni *et al.*, 2004; Bizat *et al.*, 2003) y algunas caspasas (Kim *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 2006). El gen de la huntingtina está compuesto por 47 exones y es en el exón 1 donde se encuentra una secuencia repetida inestable de CAG (Ambrose *et al.*, 1994). La huntingtina es una proteína que se expresa en casi todos los tejidos del cuerpo (Sassone *et al.*, 2009), sin embargo, el papel fisiológico de la huntingtina aún no es claro, aunque se ha asociado a los procesos de transporte vesicular, transcripción celular (Cattaneo *et al.*, 2005), apoptosis y a la regulación de la maquinaria de transporte intracelular (Borrell-Pages *et al.*, 2006; Reiner *et al.*, 2003).

La etapa de la vida en la que la enfermedad de Huntington se expresa está definida por el número de residuos que se encuentren en la huntingtina mutada; en promedio, la población que no padece de esta enfermedad tiene de 17 a 20 aminoácidos de glutamina en la huntingtina (Kremer *et al.*, 1994), pero si los residuos de glutamina son

mayores o iguales a 40 la enfermedad se expresará en la etapa adulta presentando primeramente alteraciones psiquiátricas como irritabilidad, agresividad y depresión que aunque no están definidos como síntomas de la enfermedad se ha observado que los pacientes presentan estas alteraciones psiquiátricas antes de ser diagnosticados con la enfermedad de Huntington y posteriormente se presentan las alteraciones motoras que son la principal característica de la enfermedad; si el número de residuos de glutamina sobrepasa de 60, la enfermedad se presenta entre los 15 y 20 años de edad y se caracteriza por una progresión neurodegenerativa acelerada, rigidez, convulsiones y una marcada pérdida de las capacidades cognitivas. La muerte de los pacientes jóvenes ocurre entre los 7 y 10 años después de manifestar los primeros síntomas (Rasmussen, 2000).

La neurodegeneración en la enfermedad de Huntington se observa en varias regiones del cerebro; sin embargo, la característica más notable e importante de esta enfermedad es la atrofia del estriado (Ferrante *et al.*, 1987) y se ha observado que existe una correlación entre las alteraciones de este tejido cerebral con el grado de perturbaciones motoras, cognitivas y psiquiátricas (Myers *et al.*, 1988). En pacientes asintomáticos también es significativa la atrofia del caudado y el putamen (Kloppel *et al.*, 2009; Roucco *et al.*, 2006), esto sugiere que el proceso neurodegenerativo (hinchamiento o pérdida de las neuronas) comienza antes de que se presenten los síntomas. Otros de los aspectos importantes de la enfermedad de Huntington son la atrofia de la región cortical así como la degeneración temprana del hipotálamo y en etapas avanzadas la degeneración generalizada del cerebro (Petersen y Bjorkqvist, 2006).

Las alteraciones fenotípicas de la enfermedad de Huntington son consecuencia de la pérdida selectiva de las neuronas espinosas medianas GABAérgicas del estriado (Harper, 1991; Graveland *et al.*,



1985). Cabe mencionar que durante el proceso de neurodegeneración que se lleva a cabo en la enfermedad de Huntington las neuronas grandes y medianas no espinosas se conservan (Ferrante *et al.*, 1985; 1987). Las neuronas espinosas medianas constituyen el 95% de la población total de neuronas que reciben estímulos corticales y liberan glutamato, el principal neurotransmisor en el cerebro de los mamíferos. El glutamato además de funcionar como un neurotransmisor en ciertas condiciones específicas también puede causar muerte neuronal por mecanismos de excitotoxicidad. En varios estudios se ha demostrado que la inyección intraestriatal de glutamato o de sus análogos como el ácido quinolínico (QUIN) y el ácido kaínico induce un patrón de muerte neuronal similar al descrito en la enfermedad de Huntington. Los sistemas de neurotransmisión como los dopaminérgicos o gabaérgicos al ser exacerbados propician defectos mitocondriales en el estriado, particularmente en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  que se relaciona con la excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato (Damiano *et al.*, 2010). Basados en esta evidencia experimental, la muerte neuronal por excitotoxicidad se ha sugerido como un factor importante en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, la relación entre la excitotoxicidad y la expresión de la huntingtina mutada está aún lejos de ser comprendida, sin embargo, se han realizado esfuerzos con modelos farmacológicos y transgénicos que conllevan a la comprensión de los mecanismos de la degeneración de las neuronas espinosas medianas en la enfermedad de Huntington con el fin de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la calidad de vida de los pacientes con la enfermedad de Huntington.

## 2.2. Ácido quinolínico

Las excitotoxinas son un grupo de moléculas, estructuralmente relacionadas al ácido glutámico o ácido aspártico que poseen la capacidad de despolarizar y excitar células neuronales y que bajo condiciones apropiadas producen degeneración neuronal (Moroni *et al.*, 1984a), entre algunas de estas excitotoxinas se encuentran el ácido kaínico, el ácido iboténico y el QUIN (ácido 2,3-piridin dicarboxílico). El QUIN es un compuesto que se encuentra de manera natural tanto en el cerebro humano como en el de rata (Wolfensberger *et al.*, 1983; Moroni *et al.*, 1984b) y que con el proceso de envejecimiento las concentraciones en cerebro de roedores aumentan de manera progresiva (Moroni *et al.*, 1984a). Al administrarse ionofóricamente se observa que posee potentes propiedades como excitador de los receptores glutamatérgicos para el ácido N-metil-D-aspártico (NMDA) en neuronas corticales de hipocampo y estriado y no tiene efecto en células del cerebelo ni de médula espinal (Stone *et al.*, 1981). Administrado intracerebrovascularmente en ratas el QUIN también se utiliza en modelos de epilepsia (Lapin *et al.*, 1982; Foster *et al.*, 1984) lo que pone de manifiesto sus propiedades neurotóxicas.

El QUIN es un análogo estructural del NMDA (Figura 1) y tiene propiedades neurodegenerativas tanto *in vitro* (Kim *et al.*, 1987; Garthwaite *et al.*, 1987) como *in vivo* (Foster *et al.*, 1983; Schwartz *et al.*, 1983). Antagonistas selectivos del receptor de NMDA (NMDAr) como el ácido D-2-amino-5-fosfonovalérico (Stone *et al.*, 1981), el ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico (Foster *et al.*, 1984), el ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (Garthwaite *et al.*, 1987), el MK-801 (Santamaría *et al.*, 1993) y el ácido kinurénico (Foster *et al.*, 1984) atenúan significativamente la degeneración celular neuronal y previenen un aumento en la producción de marcadores bioquímicos utilizados como

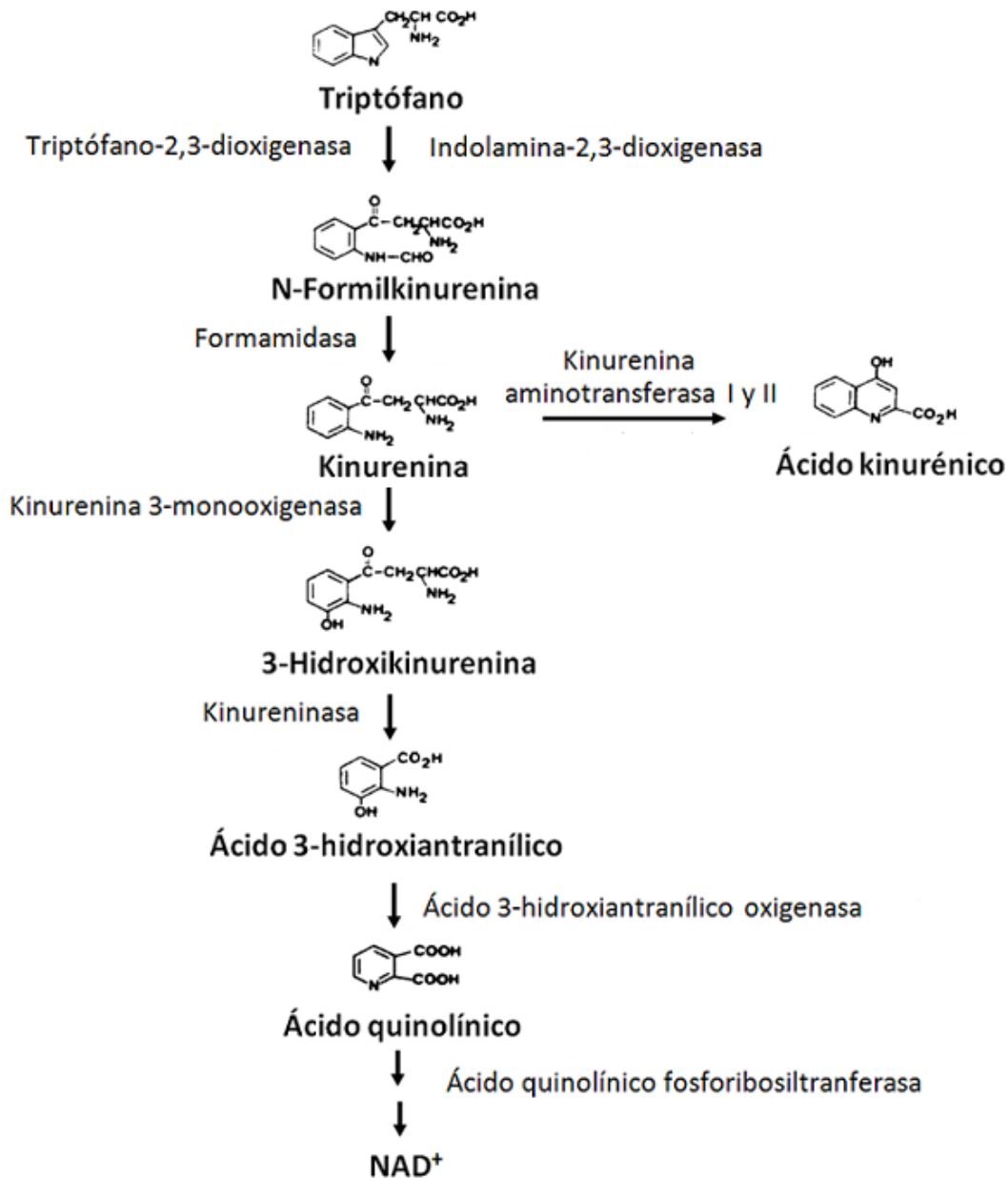
marcadores de daño producido por el QUIN. Estas características del QUIN indican que su toxicidad se debe a que mimetiza la actividad del NMDA sobre los NMDAr (Garthwaite *et al.*, 1987) y a que a determinadas concentraciones genera excitotoxicidad. La sobreactivación de estos receptores permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula incrementando los niveles intracelulares de este ion; el  $\text{Ca}^{2+}$  activará enzimas como proteasas y fosfolipasas que contribuirán a la degradación de los diferentes componentes celulares y a la muerte celular. Por otro lado, la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  lleva a una sobrecarga intramitocondrial de este catión (Damiano *et al.*, 2010), alterando su actividad e interfiriendo en la producción de ATP (Dugan y Kim-Han, 2006; Schwarcz *et al.*, 1984). Otro evento involucrado en la muerte excitotóxica es la generación de radicales libres, como resultado de la disfunción mitocondrial y de la activación de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como la xantina oxidasa, la sintasa de óxido nítrico, entre otras. Los radicales libres que se producen dañan lípidos, componentes protéicos y ácidos nucleicos celulares. (Lafon-Cazal *et al.*, 1993), contribuyendo a la cascada de muerte neuronal.



**Figura 1.** Estructura química del N-metil-D-aspartato (NMDA) y del ácido quinolínico (QUIN).

El QUIN es un metabolito de la vía de la L-kinurenina (Figura 2) que forma parte de la vía de degradación del L-triptófano que es la principal

ruta catabólica de este aminoácido en mamíferos, cuyo objetivo principal es la biosíntesis del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) (Schwarcz *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Vía de la kinurena. Degradación del triptófano en células de mamífero (Schwarcz *et al.*, 2009).

Esta vía de catabolismo del triptófano está implicada en inmunosupresiones, en enfermedades autoinmunes y en el SIDA (Belladonna *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). Aunque se ha caracterizado a cada una de las enzimas que llevan a cabo el proceso de conversión del triptófano a QUIN todavía no se sabe exactamente sus implicaciones en los procesos biológicos.

La vía de la kinurenina es de especial atención ya que además del QUIN que se produce en esta ruta catabólica se han identificado dos compuestos más con propiedades de activación neuronal: la 3-hidroxicinurenina y el ácido kinurénico (Figura 2) (Eastman *et al.*, 1989; Lapin *et al.*, 1982).

Como se mencionó anteriormente el QUIN es un agonista de los NMDAr; sin embargo, existen diferencias entre los efectos neurotóxicos del QUIN y del NMDA. A diferencia del QUIN, el NMDA presenta una potente neurotoxicidad en el cerebelo (Garthwaite *et al.*, 1986), no es específico para las diferentes poblaciones neuronales en el hipocampo (Nadler *et al.*, 1981), es más efectivo en el cerebro inmaduro que en el cerebro adulto de ratas (McDonald *et al.*, 1988) y produce pérdida celular neuronal en estriado e hipocampo cuyo daño es significativamente menos susceptible al bloqueo con ácido kinurénico. También es importante mencionar que el ácido kinurénico bloquea los efectos epileptogénicos generados por la administración intrahipocampal de QUIN (Foster *et al.*, 1984) y disminuye los índices de peroxidación lipídica en los homogenados de cerebros de rata en una relación dosis respuesta (Ríos y Santamaría, 1991). Estas evidencias junto con el hecho de que las lesiones producidas por el QUIN se pueden prevenir con antagonistas de amplio espectro para los NMDAr como los ya mencionados sugieren que el QUIN sobreactiva un subgrupo de NMDAr generando neurotoxicidad y muerte celular (DeCarvalho *et al.*, 1996; Monaghan y Beaton, 1991).

El mecanismo de toxicidad del QUIN también está asociado con sus propiedades para inducir la oxidación de los lípidos que se encuentran en el tejido cerebral (Ríos y Santamaría, 1991; Santamaría *et al.* 1993). Se ha demostrado que la administración de QUIN en cerebros de rata no sólo aumenta los niveles de lípidos oxidados sino también aumentan en el espacio extracelular las ERO y de nitrógeno, como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Santamaría *et al.*, 2001) y el peroxinitrito (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2005; Stípek *et al.*, 1997), respectivamente. La generación del  $\cdot\text{OH}$  también está relacionada a la formación de complejos hierro-QUIN que al auto-oxidarse generan esta especie reactiva de oxígeno a través de la reacción de Fenton (Pláteník *et al.*, 2001; Santamaría *et al.*, 2001).

De esta manera, la evidencia experimental sugiere que el daño neuronal producido por el QUIN está asociado con una sobreactivación de los NMDAR, que entre otras cosas genera la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Schwarcz *et al.*, 1984), provocando una sobreproducción de radicales libres dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Choi *et al.*, 1988; Bondy *et al.*, 1989) que conllevan a la alteración de biomoléculas causando la muerte celular.

El QUIN se ha utilizado como modelo de la enfermedad de Huntington en ratas, debido a que las lesiones generadas por este compuesto son similares a las que se presentan en la enfermedad de Huntington en humanos. Ejemplos de estas similitudes entre el modelo y la enfermedad son la inflamación y la atrofia en el estriado que se pueden observar a nivel macroscópico (Dunnett y Svendsen, 1993); así como la preservación en estriado de una pequeña población de neuronas de tamaño medio con dendritas redondeadas y axones cortos que contienen somatostatina y neuropéptido Y las cuales también contienen NADPH diaforasa. También la supervivencia de neuronas colinérgicas es una característica común entre el modelo con QUIN y la enfermedad de Huntington (Davies y Roberts, 1988). Con respecto a las similitudes bioquímicas se encuentran la disminución del GABA y sustancia P, estas

características no son reproducidas por el ácido kaínico, el ácido iboténico ni el NMDA (Beal *et al.*, 1986; Ferrante *et al.*, 1987). Este modelo también se ha probado al ser administrado en forma crónica en estriado y se ha observado que se mantienen las similitudes bioquímicas e histológicas de la enfermedad de Huntington hasta en el tratamiento de un año (Beal *et al.*, 1991). El modelo con QUIN se ha realizado también en primates no humanos observándose similitudes histopatológicas y neuroquímicas con la enfermedad de Huntington (Ferrante *et al.*, 1993). Como se mencionó anteriormente, el QUIN es un compuesto que se encuentra de forma natural en el organismo y debido a las ya mencionadas características y similitudes de toxicidad con la enfermedad de Huntington se sugirió que este compuesto estaba involucrado en el desarrollo de esta enfermedad, en donde una alteración en la vía de la kinurenina genera una sobreproducción de QUIN; sin embargo, las concentraciones en pacientes que son víctimas de la enfermedad de Huntington tienen niveles normales *postmortem* de QUIN en el putamen y la corteza frontal (Reynolds *et al.*, 1988) o incluso menores en fluido cerebro espinal, putamen, núcleo dentado y varias regiones corticales (Heyes *et al.*, 1991). También se ha evaluado la concentración de QUIN en las excreciones de pacientes con la enfermedad de Huntington y se han observado niveles normales de este compuesto (Heyes *et al.*, 1985). Sin embargo, se ha vuelto a retomar la idea de que el QUIN participa activamente en el desarrollo de la enfermedad ya que los estudios mencionados se llevaron a cabo en pacientes en los que el grado de la enfermedad de Huntington era avanzado, solamente se incluyó un número pequeño de muestras y sólo con fines comparativos. En un estudio reciente se midieron los niveles de 3-hidroxicinurenina, kinurenato y QUIN en estriado, corteza frontal y cerebelo en muestras *postmortem* de pacientes con la enfermedad de Huntington en estado no avanzado y se demostró que existe un

incremento de hasta 3 o 4 veces de 3-hidroxykynurenina y de QUIN en muestras de pacientes en etapa temprana de la enfermedad de Huntington por lo que la participación de estos metabolitos de la vía de la kinurenina posiblemente estén involucrados en la fase temprana de la patofisiología (Guidetti *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que el QUIN afecta las funciones colinérgicas corticales de forma similar a lo que se observa en la enfermedad de Alzheimer por lo que se puede utilizar también como una neurotoxina endógena para reproducir un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Foster *et al.*, 1984).

Actualmente se sabe qué gen desencadena la enfermedad de Huntington (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) y se utilizan ratones transgénicos en diversas investigaciones (Schiefer *et al.*, 2002) ya que estos roedores (R6/1, R6/2, N171-82Q, Hdh/Q72-80, HdhQ111, CAG140 y CAG150) presentan muchas alteraciones fenotípicas que son similares a las observadas en pacientes con la enfermedad de Huntington como alteraciones motoras, deterioro cognitivo y pérdida de peso corporal (Ferrante, 2009); sin embargo, la inyección intraestriatal de QUIN como modelo de la enfermedad se sigue utilizando ampliamente debido a que es un método sencillo, barato y que reproduce acertadamente las características bioquímicas e histológicas de la enfermedad de Huntington que se observan en humanos. Además, es claro que el estudio de los mecanismos moleculares de toxicidad del QUIN han logrado avances en la comprensión de los cambios presentes en la enfermedad de Huntington, especialmente en lo que se refiere a la excitotoxicidad (Estrada-Sánchez *et al.*, 2008), debido a lo anterior se justifica el uso de este modelo en el presente trabajo.



### 2.3. NADPH oxidasa

Un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados o impares. Estos electrones actúan como aceptores de electrones provenientes de otras moléculas, estas moléculas al ceder sus electrones se oxidan. Los radicales libres más comunes en la célula con el  $\cdot\text{OH}$ , el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el óxido nítrico. Los radicales libres y las moléculas relacionadas se clasifican como ERO por su habilidad para realizar cambios oxidantes dentro de la célula (Migliore y Coppedè, 2009).

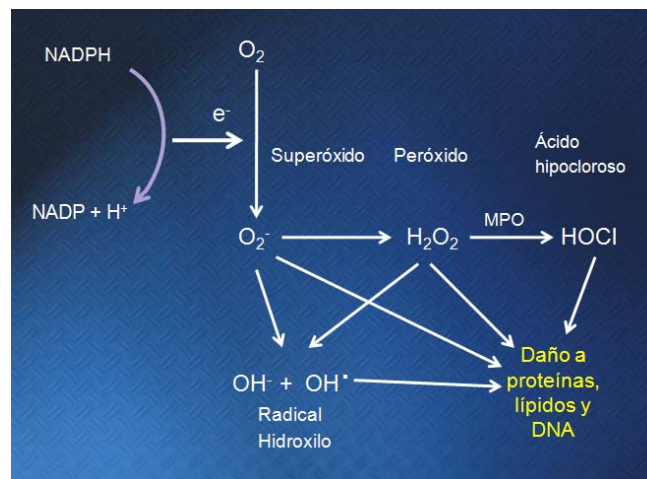
En el cuerpo humano existen varias fuentes de ERO, la sola respiración mitocondrial que es vital para el funcionamiento celular tiene como subproductos de su actividad este tipo de moléculas reactivas (Balaban *et al.*, 2005). Las funciones en el organismo de las ERO varían, por ejemplo, en bajas concentraciones regulan la homeostasis redox, controlan el tono vascular, generan respuestas celulares a los cambios en las concentraciones de oxígeno, regulan la adhesión de leucocitos al endotelio, amplifican la respuesta inmune, participan en la muerte por apoptosis, activan cinasas, inducen cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulan el crecimiento y la diferenciación celular, estimulan genes proinflamatorios, entre otras funciones biológicas más (Droge, 2002). Estas ERO al participar en el correcto funcionamiento celular deben estar reguladas de manera que exista el equilibrio entre las especies oxidantes y las especies antioxidantes. Las especies antioxidantes son sustancias que demoran o previenen la oxidación de un sustrato oxidable. Los organismos vivos han desarrollado diferentes mecanismos para contrarrestar el estrés causado por los agentes oxidantes, estos mecanismos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Entre los enzimáticos se encuentra la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, entre otras. La superóxido dismutasa cataliza la

dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y a oxígeno molecular. La glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos a agua y a alcoholes lipídicos respectivamente y oxida el glutatión a diglutatión. La catalasa cataliza la reacción de peróxido de hidrógeno a agua y a oxígeno molecular. Existen además otros mecanismos no enzimáticos como el alfa tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), el glutatión, entre otros. El equilibrio entre las especies oxidantes y las antioxidantes debe mantenerse, ya que al haber una alteración en donde existan más ERO que antioxidantes se genera el llamado estrés oxidante que se puede definir como la generación de ERO más allá de las necesidades celulares que tienen el potencial para dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los efectos de las ERO dependen de las concentraciones locales, la localización celular y la proximidad con las moléculas con las que pueden interactuar. Se ha comprobado que un exceso de las ERO participan activamente en varios modelos experimentales de patologías como la hipertensión aguda y crónica, la inflamación, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, meningitis, la isquemia-reperfusión, el Parkinson, la hemorragia subaracnoidea, el Huntington, entre otros (Chrissobolis y Faranci, 2008; Schwarcz *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007), y clínicamente se ha visto que participan en diversos daños celulares que se desarrollan como patologías, tal es el caso de múltiples problemas vasculares, la aterosclerosis, la hipertrófia cardíaca, la diabetes, entre otros (Paravicini y Touyz, 2008; Lyle y Griending, 2006; Lee y Griending, 2008). Debido a esto la producción de las ERO debe tener mecanismos que las controlen para que se generen sólo en el lugar y el momento adecuado. Un ejemplo de la producción regulada de ERO es la función llevada a cabo por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH ox) que es un complejo enzimático que fue identificado primeramente en células fagocíticas como neutrófilos, eosinófilos,

monocitos y macrófagos (Batot *et al.*, 1995; Segal *et al.*, 1981) y posteriormente se encontraron análogos de esta enzima en células no fagocíticas (Quinn *et al.*, 2004). La función de este complejo enzimático es la generación del  $O_2^{\bullet-}$  por medio de la extracción de electrones de su sustrato, el NADPH intracelular, y que posteriormente son transferidos al oxígeno molecular para generar el  $O_2^{\bullet-}$  (Babior, 1999), es decir, la oxidación del NADPH y la reducción del oxígeno molecular (Reacción 1).



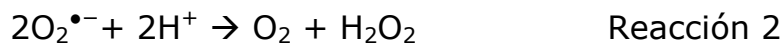
El anión superóxido generado por la NADPH ox es utilizado como materia prima para la producción de otras ERO que se utilizan para la defensa del hospedero contra patógenos bacterianos y fúngicos (Quinn *et al.*, 2004). Por otro lado, si existe una sobreactivación de esta enzima entonces se generarán daños colaterales significativos en los tejidos involucrados debido a la presencia de las ERO (Figura 3).



**Figura 3.** Productos tóxicos de la NADPH ox en neutrófilos. La NADPH oxidasa genera el ion superóxido que se dismuta a peróxido de hidrógeno. El peróxido y  $O_2^{\bullet-}$  pueden reaccionar para producir el  $\cdot OH$  en presencia de iones metálicos. El peróxido de hidrógeno puede también servir como un sustrato para la MPO (mieloperoxidasa) mediando la oxidación de haluros. Las ERO pueden entonces

producir daños al interactuar con los constituyentes celulares (Cross *et al.*, 2004).

Entre las ERO que se generan indirectamente por la acción enzimática de la NADPH ox a partir del ion superóxido se encuentra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se produce por la dismutación del ion superóxido (Liochev y Fridovich, 2007; Babior, 2004) (Reacción 2).



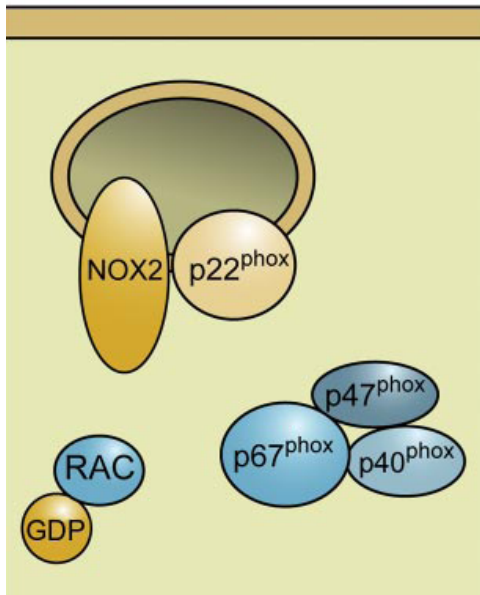
También se genera el HOCl a partir de la oxidación de Cl<sup>-</sup> con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que se origina de la reacción entre el HOCl y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Steinbeck *et al.*, 1992), el ozono (Babior *et al.*, 2003) y el ·OH, el cual se postula que se origina de la reacción de Fenton que involucra la oxidación de metales como el Fe<sup>2+</sup> o el Cu<sup>2+</sup> por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wink *et al.*, 1994) o por la reacción entre el ozono y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La importancia de la NADPH ox en células fagocíticas es clara cuando se presentan problemas clínicos derivados de su ausencia o de un mal funcionamiento de este complejo, generando la bien estudiada enfermedad crónica granulomatosa que se caracteriza por una recurrencia frecuente de infecciones bacterianas y fúngicas que se manifiesta generalmente en la infancia (Geiszt *et al.*, 2001).

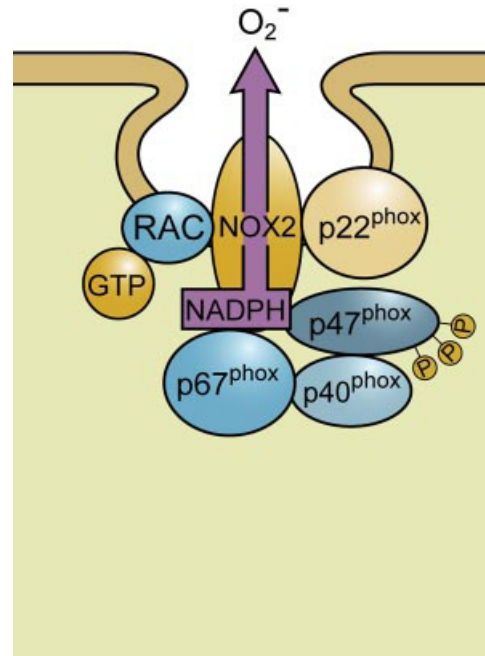
La NADPH ox descrita en neutrófilos consta de cinco subunidades: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox y la subunidad catalítica gp91phox (también llamada NOX2) (Figura 4). Cuando la enzima no está activa NOX2 y p22phox se encuentran principalmente en la membrana de vesículas intracelulares y estas dos subunidades se encuentran fuertemente asociadas, de hecho se sugiere que NOX2 es inestable en ausencia de p22phox ya que se ha visto que en pacientes con deficiencia de p22phox también presentan carencia de la proteína

NOX2. La activación de la NOX2 requiere la traslocación de los factores citosólicos al complejo NOX2/p22phox (Figura 4).

A)



B)

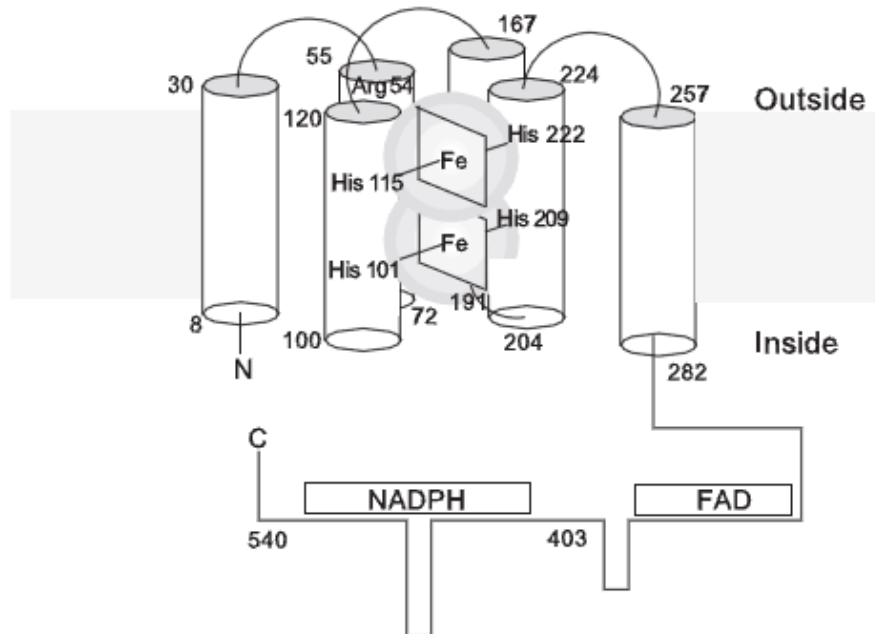


**Figura 4.** Ensamblado de los componentes de la NADPH oxidasa. En estado no activado las subunidades NOX2 y p22phox se encuentran principalmente en la membrana intracelular de vesículas y se encuentran fuertemente asociadas dando estabilidad una a la otra. Los otros componentes celulares se encuentran en el citoplasma fuera de la vesícula (A). Cuando se lleva a cabo la activación existe un intercambio de GDP a GTP en RAC que activa a esta subunidad. La fosforilación de la subunidad citosólica p47phox le produce cambios conformacionales que le permiten interactuar con p22phox. El movimiento de p47phox atrae a p67phox y p40phox para formar finalmente el complejo activo. Una vez activado, hay una fusión de las vesículas que contienen a NOX2 con la membrana plasmática. El complejo activo transporta electrones del NADPH intracelular al oxígeno extracelular para generar ion superóxido (Bedard y Krause, 2007) (B).

La activación de la NADPH ox se debe a la fosforilación de p47phox que lleva a un cambio conformacional que permite la interacción con p22phox. La subunidad p47phox organiza la traslocación de los otros factores citosólicos, es por esta razón que se le llama "subunidad organizadora". La localización de p47phox en la membrana atrae a la

“subunidad activadora”, p67phox, que se pone en contacto con NOX2 y también atrae a la pequeña subunidad p40phox al complejo. Finalmente, la GTPasa RAC interactúa con NOX2 y posteriormente con p67phox. Una vez que se ha ensamblado, el complejo activo comienza a generar  $O_2^{\bullet-}$  por la transferencia de un electrón del NADPH en el citosol al oxígeno en el espacio extracelular (Bedard y Krause, 2007) (Figura 4).

La gp91phox es una glicoproteína de 570 aminoácidos integrada a la membrana plasmática y también se encuentra en la membrana de gránulos específicos en neutrófilos y tiene una masa molecular de 91 kDa, contiene dos grupos hemo no idénticos, uno de los cuales apunta hacia el interior de la membrana y el otro hacia el exterior (Cross *et al.*, 1995; Biberstine *et al.*, 2001). En la región N-terminal presenta seis alfa hélices transmembranales que contienen cuatro residuos de histidina que están completamente conservados entre todas las enzimas homólogas conocidas, estos residuos de histidina, localizados en las alfa-hélices 3 y 5 proveen los ligandos axiales y distales para la unión de hierro a los grupos hemo (Kawahara y Lambeth, 2007). Además contiene un dominio de unión al NADPH y otro al FAD en la región citoplasmática C-terminal, formado así un núcleo que transporta electrones del NADPH, vía el FAD y dos hemo al oxígeno molecular (Sumimoto *et al.*, 2008) (Figura 5).



**Figura 5.** Modelo de la subunidad catalítica gp91phox. Se observan las seis hélices transmembrales y los extremos amino y carboxilo terminales que se organizan como se muestra en el esquema. Los dos grupos hemo se encuentran dentro de la membrana, uno está ubicado hacia el exterior de la membrana y se encuentra en los residuos de His115 e His222. El segundo hemo está ubicado hacia el interior de la membrana y se encuentra en los residuos His101 e His209. Los dominios de unión a NADPH y FAD se localizan en la parte C-terminal de la proteína. En la membrana gp91phox está asociada con p22phox (aquí no se muestra a p22phox) (Cross y Segal, 2004).

A los homólogos de gp91phox en mamíferos se les ha dado el nombre de NOX (NADPH oxidasa) o Duox (oxidasa dual). En humanos se han encontrado siete genes que codifican para homólogos de gp91phox que son de la NOX1 a la NOX5 y Duox1 y Duox2 (Lambeth *et al.*, 2007). La subunidad gp91phox junto con p22phox forma el flavocitocromo b558 que también es llamado NOX2 y que está integrado a la membrana, las subunidades que son citosólicas son p47phox, p67 phox, 40phox y RAC1 o RAC2 (Dworakowski *et al.*, 2008).

Aunque la NADPH ox originalmente se consideró como una enzima que únicamente se expresaba en células fagocíticas que involucraban la defensa del huésped y la inmunidad innata, hoy en día se sabe que la

familia de las NADPH oxidasas se expresa en muchos tejidos y median diversas funciones biológicas. La NOX1 se encuentra en colon y en células vasculares y participa en la defensa del huésped y en el crecimiento celular; la NOX2 es la subunidad catalítica de la oxidasa en fagocitos, pero también se expresa en células vasculares, cardíacas, renales y neuronales; la NOX3 se encuentra en tejido fetal y en oído medio del adulto y participa en la función vestibular; la NOX4 fue originalmente llamada Renox (oxidasa renal) debido a su abundancia en el riñón, también se encuentra en células vasculares y osteoclastos; la NOX5 es un homólogo que se encuentra en testículos y tejido linfoide así como en células vasculares. La Duox1 y la Duox2 son enzimas tiroideas involucradas en la biosíntesis hormonal mediada por la tiroides. Todas las proteínas NOX están presentes en la mayoría de los roedores y en el humano; el genoma del ratón y de la rata no contiene el gen para NOX5 (Paravicini *et al.*, 2008).

En cerebro se ha encontrado el mRNA de la familia las NOX, especialmente de la NOX2 y pequeñas cantidades de la NOX4 y la NOX5 (Cheng *et al.*, 2001). Así mismo, se han encontrado todos los componentes de la NADPH ox en el cerebro de ratón especialmente en hipocampo, corteza, amígdala, estriado y tálamo (Serrano *et al.*, 2003).

El cerebro consume el 20% del oxígeno que circula por el cuerpo lo que se traduce en una alta producción de ERO. Además el sistema nervioso es particularmente sensible al estrés oxidante debido a la gran cantidad de ácidos no saturados en muchas de las membranas de las células que lo conforman y a la relativamente baja abundancia de defensas antioxidantes (Sun *et al.*, 2007).

Las células que constituyen al sistema nervioso central son principalmente las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos y también microglia. La microglia son células parecidas a los macrófagos y por lo tanto producen grandes cantidades de ERO a través de la



NADPH oxidasa (Vilhardt *et al.*, 2002). Los oligodendrocitos son responsables de la mielinación en el sistema nervioso central, no se ha encontrado evidencia de que generen ERO, sin embargo, estas células son responsables de generar ERO en células vecinas (Atkins y Sweatt, 1999). Los astrocitos son células gliales con una compleja función en el sistema nervioso central: proveer sustratos y moléculas reguladoras para las neuronas y también participan en la respuesta inflamatoria. Los astrocitos producen ERO a través de las NADPH oxidasas (Abramov y Duchon 2005; Pawate *et al.*, 2004).

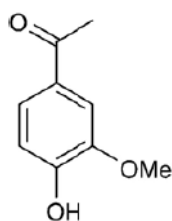
Debido a que la NADPH ox representa una fuente de ERO en el tejido nervioso se podría considerar como una de las causas de la neurodegeneración por estrés oxidante en el modelo con QUIN en ratas, por lo que para poner en evidencia la participación de este complejo enzimático se inhibió esta enzima de manera selectiva para lo cual se utilizó APO.

#### **2.4. Apocinina**

Con base en las evidencias de la presencia y participación de la NADPH ox en la generación del anión superóxido en diferentes tejidos, se ha sugerido que bloquear o disminuir la actividad de esta enzima podría disminuir los efectos tóxicos generados por este radical. Existen varios inhibidores de la NADPH ox, entre ellos se encuentran la APO, el fluoruro de aminoetil benzensulfonil también conocido como Pefabloc® y el péptido antibiótico PR-39 (Shi *et al.*, 1996), estos tres inhibidores previenen la unión de p47phox a p22 phox. También existe el cloruro de difenileno yodonio (DPI) que es un inhibidor de flavoproteínas (Sun *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2003), el óxido nítrico también es un potente inhibidor debido a que produce una S-nitrosilación en p47phox alterando

la interacción de esta subunidad con el resto de la proteína (Selemidis *et al.*, 2007).

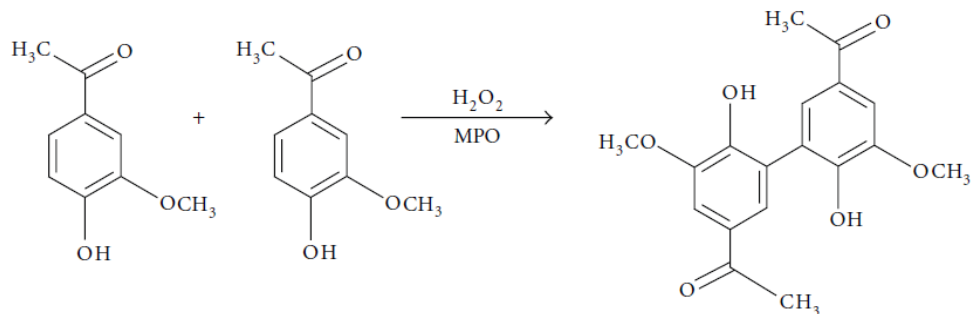
La APO también es llamada acetovanillona y su nombre químico es 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona. Es una molécula pequeña que fue descrita por primera vez en 1883 por Schmiedeberg y fue aislada de las raíces de la planta *Apocynum cannabinum*; se extrae de la planta medicinal *Picrorhiza kurroa* que es una planta nativa de las montañas de la India, Nepal, Tíbet y Pakistán y es utilizada en la medicina tradicional (Stefanska y Pawliczak, 2008). Tiene un peso molecular de 166.17, forma agujas cuando se recristaliza de agua y su punto de fusión es de 115°C (Luchtefeld *et al.*, 2008) (Figura 6).



**Figura 6.** Fórmula estructural de la apocinina.

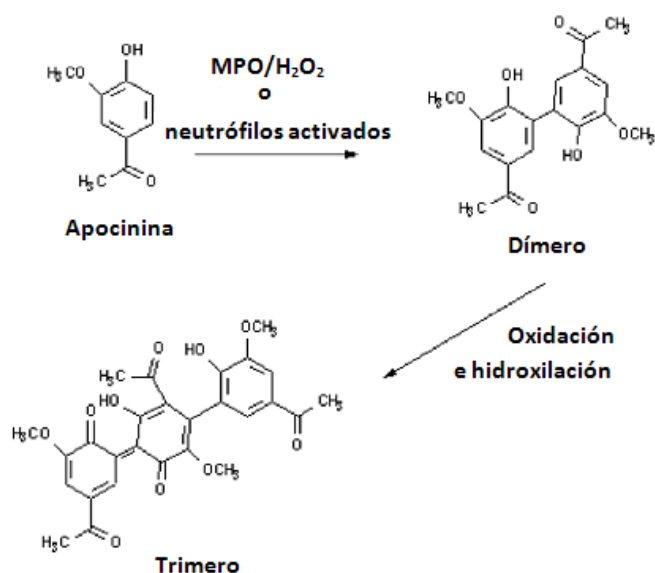
La APO se ha utilizado como inhibidor de la NADPH ox en neutrófilos siendo su principal papel el disminuir la producción de anión superóxido; sin embargo, no afecta otras actividades celulares como la fagocitosis (Simons *et al.*, 1990; Stolk *et al.*, 1994). El mecanismo por el cual actúa la APO sobre la enzima aún no se conoce en su totalidad; sin embargo, se ha sugerido que bloquea el ensamblado de la NADPH oxidasa (Stolk *et al.*, 1994) impidiendo que la subunidad citosólica p47phox se integre al complejo enzimático (Barbieri *et al.*, 2004).

Un mecanismo de acción propuesto es que la APO primeramente es metabolizada en el organismo formando oligómeros de APO, esta reacción es catalizada por la mieloperoxidasa (Johnson *et al.*, 2002) (Figura 7).



**Figura 7.** La apocinina se oxida por medio de una reacción catalizada por la mieloperoxidasa (MPO) en presencia de peróxido de hidrógeno que genera un dímero de apocinina (Stefanska y Pawliczak, 2008).

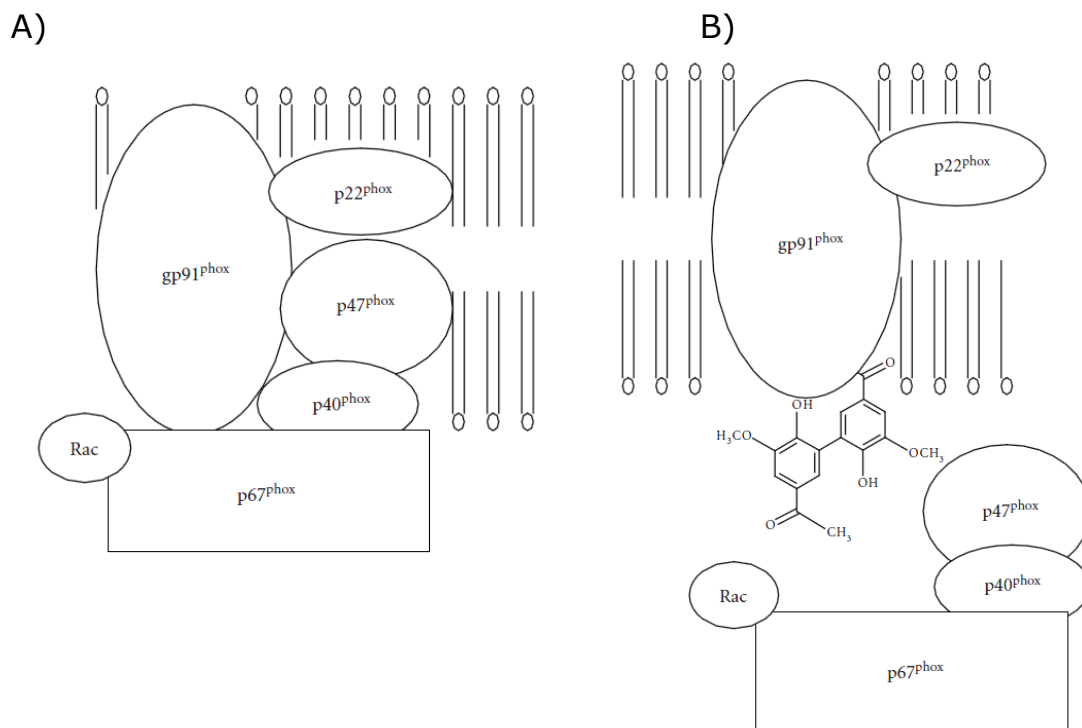
También se ha visto que la mieloperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno no sólo cataliza la formación de dímeros sino también de otros oligómeros de APO a través de la generación de radicales de APO y que estos compuestos son incluso más activos que la APO en su forma monomérica (Kanegae *et al.*, 2007; Stefanska y Pawliczak, 2008; Ximenes *et al.*, 2007) (Figura 8).



**Figura 8.** Ruta de la oxidación de la apocinina catalizada por la mieloperoxidasa que genera trímeros de apocinina. (Ximenes *et al.*, 2007). MPO: mieloperoxidasa.

Aunque la oxidación de la APO a metabolitos más activos se atribuye a la acción catalítica de la mieloperoxidasa no se debe descartar que otros oxidantes celulares sean capaces de oxidar a la APO (Ximenes *et al.*, 2007) ya que este compuesto es un inhibidor de la NADPH ox en células endoteliales que no contienen mieloperoxidasa (Johnson *et al.*, 2002).

Una vez formados estos oligómeros de APO intervienen en la traslocación de p47phox a NOX2 (Simons *et al.*, 1990; Stolk *et al.*, 1994) (Figura 9).

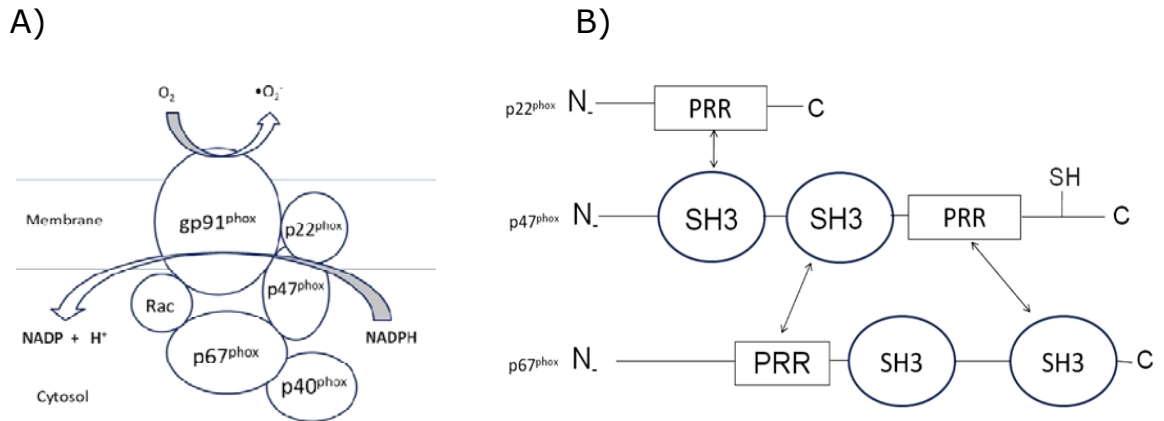


**Figura 9.** A) NADPH oxidasa en su forma activa. B) Mecanismo de inhibición de la apocinina (Stefanska y Pawliczak, 2008).

Estos metabolitos de la APO podrían formar enlaces covalentes conocidos como aductos de Michaels (Crabb *et al.*, 2002) con los residuos de cisteína de la subunidad p47<sup>phox</sup> (Simons *et al.*, 1990; Hart *et al.*, 1990) tal y como lo hace el óxido de fenilarzina que es un inhibidor de la NADPH ox, que se une covalentemente a los grupos tioles de la enzima, evitando así su ensamblado y activación (Le Cabec *et al.*, 1995).

Se sabe que la subunidad p47<sup>phox</sup> contiene cuatro residuos de cisteína en las posiciones 98, 11, 196 y 378 y es justamente en la cisteína 196 que existe uno de los dos dominios SH3 de p47<sup>phox</sup> (Figura 10 A) que interactúan con una región rica en prolina de la subunidad membranal p22<sup>phox</sup> de la NADPH oxidasa (Figura 10 B) (Leto *et al.*, 1994; Babior, 1999; Groemping *et al.*, 2005), de esta manera, si se modifica la

cisteína 196 por una quinona proveniente de la polimerización de la APO entonces puede prevenir el ensamble de la NADPH oxidasa aunque no se descarta la posibilidad de cambios conformacionales de la subunidad p47phox por la interacción de quinonas con algún otro residuo de cisteína presente en la proteína (Mora-Pale *et al.*, 2009).



**Figura 10.** Complejo activo de la NADPH oxidasa. A) Las subunidades citosólicas (p47phox, p67 phox, p40 phox y RAC 1 o RAC 2 se traslocan a la membrana para unirse a p22phox y a la unidad catalítica gp21phox. B) La unión de las subunidades (en membrana y citosol) se deben a la interacción de los dominios SH3 de p47phox con las regiones ricas en prolina (PRR) de p22phox y de p67phox (Mora-Pale *et al.*, 2009).

La APO es un compuesto que ha sido ampliamente estudiado en modelos animales dando resultados favorables en modelos de asma (Dodd-o *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 1990), artritis (Salmon *et al.*, 1998), daño cerebral por isquemia/reperfusión (Tang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2007), aterosclerosis (Holland, 1999) y tiene efectos similares a los producidos con el bloqueo de la ciclooxigenasa tal y como lo hacen los antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno (Hougee *et al.*, 2006; Labefer *et al.*, 1999). En estos estudios el papel que la APO juega es el de disminuir los niveles de especies oxidantes celulares. Estas características de la APO dan cabida

a la continua investigación de este compuesto y en el presente trabajo a evaluar su participación en la inhibición de la NADPH ox en un modelo experimental de Huntington en ratas.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Materiales**

El ácido quinolínico (QUIN), la apomorfinina, el  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido ( $\beta$ -NADH), el cloruro de difenileno yoduro (DPI), la apocinina (APO), la L-arginina, la xantina, el N-[2-hidroxietil] piperazina-N-[ácido-2-etanosulfónico] (HEPES), el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y el DNA de testículo de salmón se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). El dihidroetidio (DHE) se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), etanol y metanol se obtuvieron de Mallinckrodt Baker (Xalostoc, Edo. México, México). Todos los demás reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas. Se utilizó agua desionizada de un sistema Milli-RQ (Millipore, Bedford, MA. USA) para preparar las soluciones.

#### **3.2. Animales**

Se utilizaron ratas Wistar con un peso entre 270-320 g criadas bajo condiciones constantes de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), humedad (50%  $\pm$  10%) y luz (ciclos de 12 h de luz y oscuridad) en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Para todos los propósitos experimentales, se mantuvieron en cajas de acrílico con cinco animales por caja y se les dio alimento comercial para rata (Laboratory rodent diet 5001; PMI Feed Inc., Richmon, IN) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con

animales se llevaron a cabo de acuerdo a la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio y a los parámetros locales sobre ética en el uso de animales por el Ministerio de Salud de México. Durante todos los experimentos, se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

### **3.3. Diseño experimental**

Se diseñaron dos esquemas diferentes para evaluar la eficacia de la APO como un inhibidor de la NADPH oxidasa. El primer esquema consistió en evaluar su protección al aplicarlo antes y después de la lesión intraestriatal con QUIN, en el segundo esquema únicamente se evaluó su actividad postlesión. Se decidió realizar estos dos esquemas en base a la rápida activación de la NADPH oxidasa después de un evento tóxico. El QUIN es un compuesto que administrado de forma intraestriatal en roedores y primates no humanos reproduce algunas de las características de la enfermedad de Huntington (Shear *et al.*, 1998). Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la mañana a partir de las 7 am. Se utilizaron seis grupos de ratas, en donde cada grupo tenía siete ratas ( $n = 7$ ). Los esquemas de trabajo para cada grupo fue de la siguiente manera: CT (control) y QUIN recibieron dos administraciones sistémicas de vehículo (solución salina isotónica i.p.); los grupos APO(-30/+60) y QUIN + APO(-30/+60) recibieron dos dosis de APO (5 mg/kg, i.p.), la primera se administró 30 min antes y la segunda 60 min después de haber realizado la infusión intraestriatal; finalmente los grupos APO(+30) y [QUIN + APO(+30)] recibieron únicamente una administración de APO (5 mg/kg, i.p.) 30 min después de que se realizó la infusión intraestriatal. Los grupos CT, APO(-30/+60) y APO(+30) también recibieron una infusión de vehículo en el estriado derecho, mientras que los grupos QUIN, QUIN + APO(-30+60) y QUIN +



APO(+30) recibieron una sola administración intraestriatal de 1  $\mu$ l de QUIN (240 nmol/ $\mu$ l). Las inyecciones intraestriatales se llevaron a cabo en ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), y en las siguientes coordenadas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma, y +4.5 mm ventral a la dura (Paxinos and Watson, 1998). Una vez realizada la inyección intraestriatal se mantuvo a los animales con vida por 2 h para realizar el ensayo espectrofotométrico de fluorescencia (actividad de la NADPH oxidasa); por 3 h para realizar el ensayo de peroxidación lipídica y por 7 días para realizar las pruebas de conducta e histología. Estos tiempos están basados en reportes previos en donde se demuestra que en el curso de pocas horas e incluso en los minutos posteriores a la lesión con QUIN ya existe un daño oxidativo considerable en estriado, por otro lado, los cambios más notables en la conducta y en la morfología son evidentes después de algunos días posteriores a la lesión (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000; Santamaría *et al.*, 2003a; Silva-Adaya *et al.*, 2008).

#### **3.4. Ensayo espectrofotométrico de fluorescencia para la detección de $O_2^{\cdot-}$ en homogenados de estriado de rata**

Las muestras de estriado se mantuvieron en hielo y se homogeneizaron por sonicación con una solución de buffer HEPES que contenía las siguientes concentraciones: HEPES 25mM, EDTA 1 mM y PMSF 0.1 mM. Posteriormente los homogenados se centrifugaron a 6,000 g por 5 min a 4°C y se separó el sobrenadante, que contenía los componentes citosólicos y se desechó el sedimento. Se tomaron 20  $\mu$ g de los homogenados obtenidos de la centrifugación y se incubaron en una placa con DHE 0.02 mM, DNA de testículo de salmón 0.5 mg/ml y el correspondiente sustrato para la NADPH oxidasa, esta incubación se llevó a cabo a 37°C por 30 min y en ausencia total de luz.

Para detectar la presencia del anión superóxido y su posterior medición cualitativa se aprovecharon las propiedades oxidantes de esta especie. El anión superóxido oxida al DHE produciendo etidio que se intercala en el DNA de salmón, la fluorescencia por la asociación DNA-etidio fue producida por excitación a 480 nm y detectada a 610 nm (Satoh *et al.*, 2005). Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas (Synergy HT; Biotek).

El sustrato utilizado en la mezcla de reacción fue el NADH a una concentración de 0.1 mM. Un blanco sin el homogenado se utilizó para medir la fluorescencia de fondo y esta medición se sustrajo de cada muestra.

Para confirmar que la NADPH oxidasa se encontraba realmente contribuyendo a la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en el estriado de rata, se analizó el efecto sobre la intensidad de la fluorescencia producida por el DNA-etidio de otro inhibidor de la NADPH oxidasa, el DPI, a una concentración de 0.1 mM y se comparó con el efecto del inhibidor en prueba, la APO, a la misma concentración.

Como es posible que el  $O_2^{\bullet-}$  provenga también de otras fuentes celulares se realizaron ensayos adicionales en donde se agregaron sustratos de fuentes potenciales de ion superóxido. Los sustratos fueron xantina (0.1 mM) como sustrato para la xantina oxidasa; succinato (5 mM) como sustrato para la producción mitocondrial de ion superóxido y L-arginina (1 mM) como sustrato de la sintasa de óxido nítrico (Satoh *et al.*, 2005).

### **3.5. Ensayo para la cuantificación de la peroxidación lipídica**

La lipoperoxidación en tejido estriatal se cuantificó por medio de la detección de la fluorescencia de productos lipídicos oxidados, 2 h después de la administración del QUIN o bien de la solución salina según fuera el grupo de trabajo (Perez-Severiano *et al.*, 2004).

Una vez extraídos los estriados se homogeneizaron en 1.2 ml de solución salina isotónica. Alícuotas de 1 mL de este homogenado se agregaron a 4 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v). Cada muestra se agitó en vortex durante 10 segundos, la mezcla se dejó reposar por 30 min para permitir la separación de fases. Una vez separadas únicamente se conservó la fase orgánica para la medición de la fluorescencia que se llevó a cabo en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS55 a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del equipo se ajustó con una solución estándar de quinina (0.1 mg/ml). Con los 0.2 ml restantes del homogenado original se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Lowry para expresar el resultado como intensidad de fluorescencia relativa por mg de proteína (I.F.R).

### **3.6. Pruebas de conducta**

La conducta de rotación se tomó como una alteración motriz derivada del daño al estriado de los animales. Se realizó la prueba de conducta a todos los animales de todos los grupos experimentales. Transcurridos 6 días de la lesión intraestriatal se administró apomorfina (1 mg/kg s.c.) a cada rata y se colocaron en cajas de acrílico individuales. Cinco minutos después de haber recibido la administración de apomorfina se contaron los giros ipsilaterales durante una hora. Un giro se definió como una vuelta de 360° (Pérez de la Cruz *et al.*, 2005; Silva-Adaya *et al.*, 2008)

### **3.7. Análisis histológicos**

Los tejidos cerebrales se recolectaron y se procesaron de acuerdo a descripciones previas (Silva-Adaya *et al.*, 2008).

Siete días después de la infusión intraestriatal de QUIN o de solución salina, se anestesió a los animales con 0.3 ml de hidrato de cloral y se perfundieron transcardialmente con una solución amortiguada de fosfatos (PBS) que contenía heparina en una proporción de 1/500 (v/v). A continuación se perfundió con una solución a 4°C de formaldehído al 10% (v/v). Se prosiguió a obtener el tejido cerebral de la rata y se fijaron por 24 h en una solución de formalina. Posteriormente, los tejidos se incluyeron en parafina, y se obtuvieron cortes en un micrótopo 820 Histo-STAT (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA) de 6 µm cada 100 µm de corte cubriendo una distancia de 300 µm (100 µm anteriores y 100 µm posteriores a la lesión con la aguja). Todas las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina para visualizar la morfología de los cuerpos celulares.

### **3.8. Evaluación cuantitativa de las lesiones**

Para la cuantificación de células en las preparaciones se tomaron al azar en promedio 10 campos de tres cortes por cerebro. El criterio para cuantificar neuronas dañadas incluyó núcleos picnóticos, vacuolación citoplásmica y atrofia neuronal.

### **3.9. Análisis estadístico**

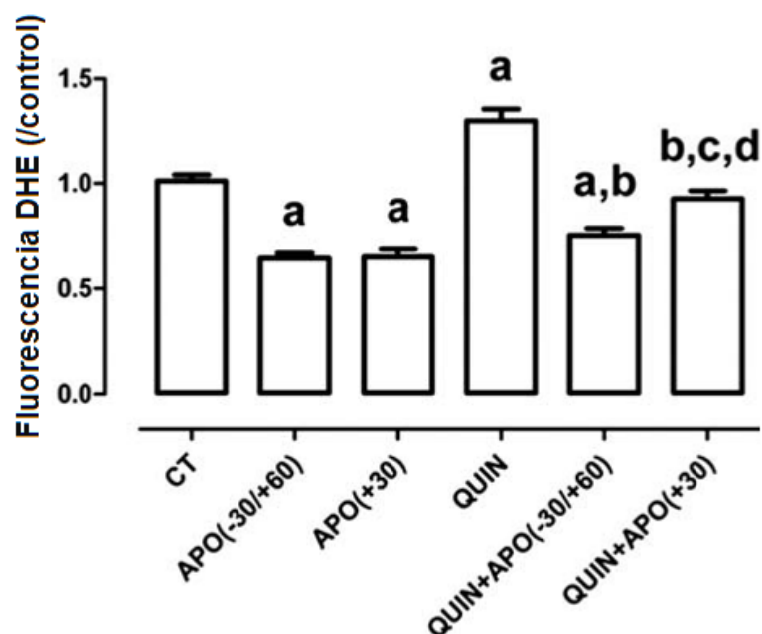
Todos los datos están presentados como la media  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey o

Bonferroni, usando el software Prism 5.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

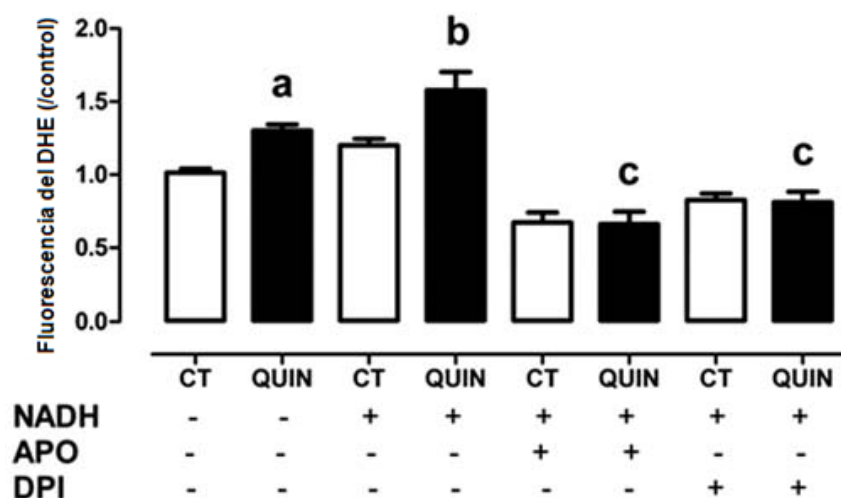
### 4.1. Detección de $O_2^{\bullet-}$

La fluorescencia detectada en los homogenados de estriado de ratas tratadas con QUIN fue 1.3 veces mayor con respecto al control, lo que indica un aumento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en los homogenados que provenían de ratas inyectadas con QUIN. Además, en los dos esquemas experimentales de trabajo en los que se administró tanto APO como QUIN se detectó una disminución de producción de  $O_2^{\bullet-}$  (Figura 11). La administración de dos dosis de APO [QUIN + APO(-30/+60) =  $0.75 \pm 0.07$  fluorescencia DHE (/control)] redujo de manera más efectiva la producción de  $O_2^{\bullet-}$  que una sola dosis de APO [QUIN + APO(+30) =  $0.93 \pm$  DHE fluorescencia(/control)]. Tanto en el tratamiento con APO(-30/+60) =  $0.65 \pm 0.05$  como en el APO(+30) =  $0.7 \pm 0.07$  se observó la reducción de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  con respecto al control (Figura 11), lo que pone de manifiesto que la administración *in vivo* de APO es capaz de atenuar la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en los homogenados de estriado de ratas tratadas con QUIN.



**Figura 11.** Efecto de la administración *in vivo* de QUIN y/o APO sobre la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en homogenados de estriado de rata. El ensayo se cuantificó por medio de la fluorescencia emitida por el dihidroetidio (DHE). Los animales se sacrificaron 2 h después de la infusión de QUIN o solución salina. Los datos se expresan con respecto a los animales control (CT), a los que se les administró solución salina isotónica intraestriatalmente. Los valores son la media  $\pm$  SEM de cuatro o cinco animales. <sup>a</sup>P < 0.001 vs el grupo CT. <sup>b</sup>P < 0.001 vs el grupo QUIN. <sup>c</sup>P < 0.001 vs el grupo APO (+30). <sup>d</sup>P < 0.05 vs el grupo APO (-30/+60).

Por otro lado, la adición de NADH en los homogenados de estriado de las ratas tratadas con QUIN aumentó aún más la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , lo que sugiere que la fuente primaria de  $O_2^{\bullet-}$  es la NADPH ox. Esto último se comprobó al agregar inhibidores de la NADPH ox en los homogenados, estos inhibidores fueron el cloruro de difenileno yodonio (DPI) y la apocinina (APO). Ambos lograron disminuir la producción de  $O_2^{\bullet-}$  inducida por la NADPH ox (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de la adición de NADH y de inhibidores de la NADPH oxidasa sobre la producción de  $O_2^{\bullet-}$ . Se cuantificó por medio de un ensayo de fluorescencia con dihidroetidio (DHE) en homogenados de estriado de rata. Los animales se sacrificaron 2 h después de la inyección intraestriatal de QUIN o de solución salina. Los datos muestran los efectos del cloruro de difenileno yodonio (DPI) o apocinina (APO) sobre la producción de  $O_2^{\bullet-}$  inducida por el NADH en homogenados de estriado tanto en muestras control (barras blancas) como en muestras tratadas con QUIN (barras negras). Los datos se expresan con respecto al control (sin NADH y sin inhibidores de la NADPH ox). Los valores son la media  $\pm$  SEM de cuatro o cinco animales. <sup>a</sup>P < 0.05 vs la columna 1 (CT): NADH(-), APO(-) y DPI(-). <sup>b</sup>P < 0.05 vs la columna 2 (QUIN): NADH(-), APO(-) y DPI(-). <sup>c</sup>P < 0.001 vs la columna 4 (QUIN): NADH(+), APO(-) y DPI(-).

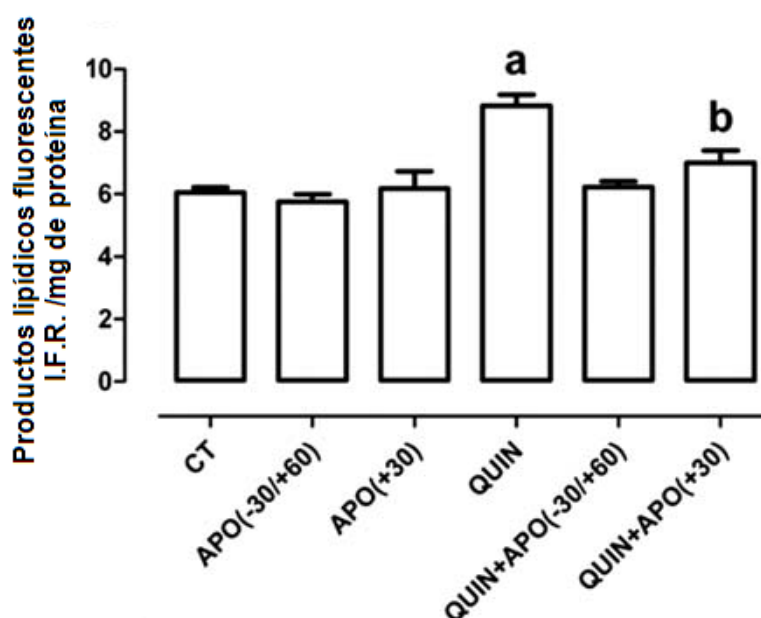
Es de remarcar que no se observó un aumento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en los homogenados de estriado de ratas tratadas con QUIN a los que se les adicionó por separado xantina, succinato y arginina (tabla 1).

**Tabla 1.** Producción *in vitro* de  $O_2^{\bullet-}$  en homogenados de estriado de ratas tratadas *in vivo* con QUIN en presencia de diferentes sustratos.

Grupo	Fluorescencia de DHE (/control)
<b>QUIN</b>	1.3 $\pm$ 0.04
<b>QUIN + xantina</b>	1.0 $\pm$ 0.1
<b>QUIN + succinato</b>	1.1 $\pm$ 0.1
<b>QUIN + L-arginina</b>	1.2 $\pm$ 0.1

## 4.2. Lipoperoxidación

La administración intraestriatal de QUIN en ratas incrementó la formación de productos lipídicos fluorescentes en un 45% con respecto al grupo control (CT), mientras que los tratamientos con APO disminuyeron la formación de productos lipídicos fluorescentes hasta niveles basales (Figura 13).

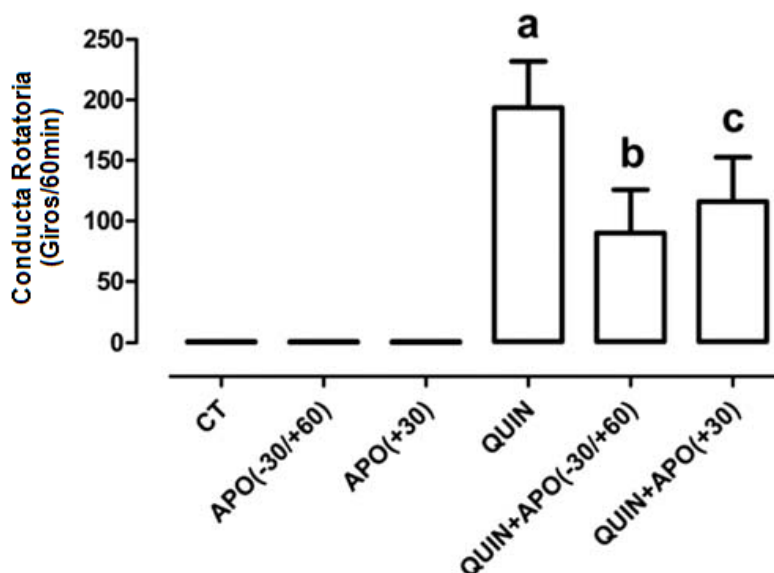


**Figura 13.** Efecto de la apocinina (APO) sobre la peroxidación lipídica inducida por el QUIN. Se cuantificó la Intensidad de fluorescencia relativa (I.F.R.) producida por los productos de la peroxidación lipídica. Las ratas recibieron APO (5 mg/kg, i.p.) o solución salina 30 min antes y 1 h después de las inyecciones intraestriatales de QUIN (240 nmol/ $\mu$ l) [QUIN + APO(-30/+60) o 30 min después de la inyección con QUIN [QUIN + APO(+30)]. 3 h después de la infusión de QUIN o solución salina se obtuvieron los estriados para el ensayo. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=6). <sup>a</sup>P < 0.001 vs los grupos control (CT), APO(-30/+60), APO (+30) y QUIN + APO(-30/+60). <sup>b</sup>P < 0.01 vs el grupo QUIN.



### 4.3. Conducta rotatoria

El QUIN produce un promedio de  $194 \pm 38$  giros ipsilaterales, mientras que el tratamiento con APO en ambos esquemas de experimentación redujo significativamente este promedio. Para el grupo QUIN + APO(-30/+60) se obtuvo un promedio de  $90 \pm 36$  y para el grupo QUIN + APO (+30) fue de  $116 \pm 37$  giros ipsilaterales. Los grupos CT y APO (+30) no presentaron conducta rotatoria (Figura 14).

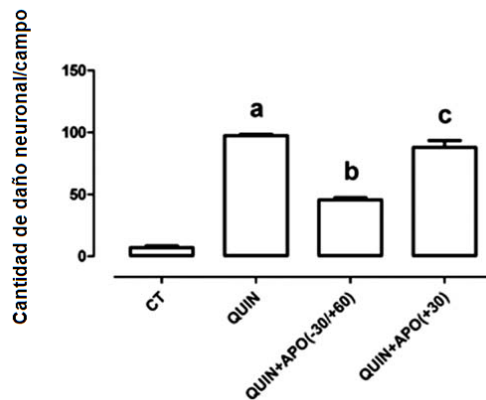
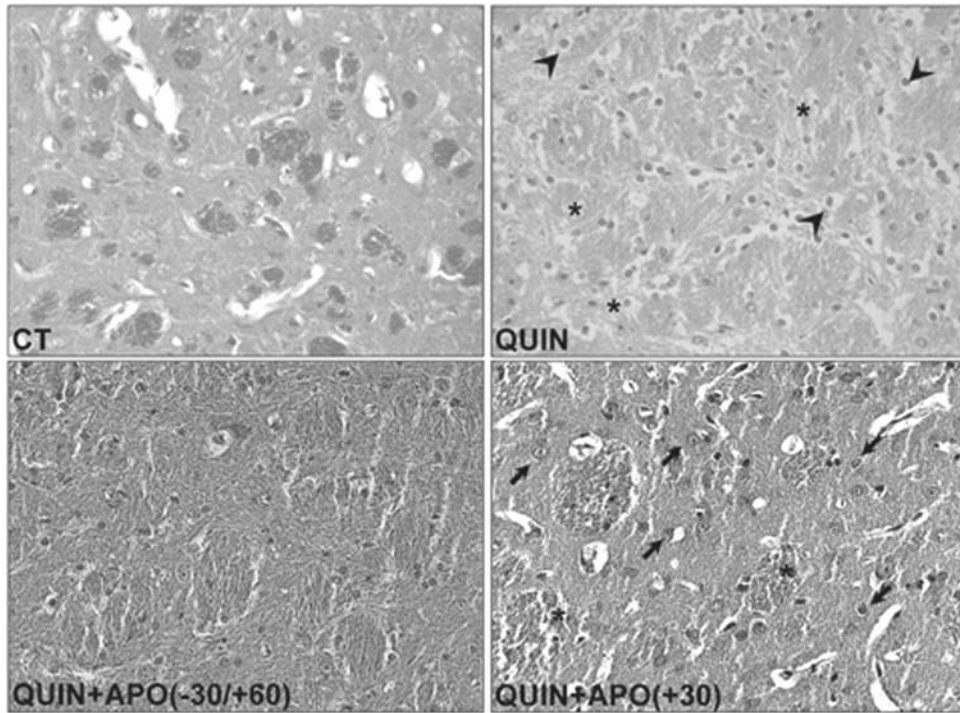


**Figura 14.** Efecto de la apocinina (APO) sobre la conducta rotatoria inducida por el QUIN en ratas. Se administró a los animales con APO (5 mg/kg i.p.) o solución salina 30 min antes y 1 h después de la infusión de QUIN (240nmol/ $\mu$ l) [QUIN + APO(-30/+60)] o 30 min después del QUIN [QUIN + APO(+30)]. 6 días después, las ratas recibieron apomorfina (1 mg/kg, s.c.) y la conducta rotatoria se registró durante 1 h. Los valores son la media  $\pm$  SEM (n=7). <sup>a</sup>P < 0.001 vs los grupos control (CT), APO(-30/+60) y APO(+30). <sup>b</sup>P < 0.01 vs el grupo QUIN. <sup>c</sup>P < 0.05 vs los grupos CT, APO(-30/+60), APO(+30) y QUIN.

#### **4.4. Análisis histológico**

Se observó un claro contraste entre la apariencia del tejido estriatal bien conservado del grupo control (CT) y el tejido del grupo QUIN que presentó un considerable daño celular. El tejido expuesto a QUIN presentó gran pérdida neuronal sobre la sección dorsal del estriado, abundantes núcleos picnóticos, células hinchadas y destrucción del neuropilo. Únicamente la administración de dos dosis de APO fue capaz de prevenir algunas de estas alteraciones producidas por el QUIN [QUIN + APO(-30/+60) (Figura 15, panel superior).

Cuando se administra únicamente la APO en cualquiera de los dos modelos experimentales se observan características similares a las del grupo CT (no se muestran imágenes). Estos resultados fueron respaldados por la cuantificación del daño al tejido nervioso: los animales del grupo QUIN + APO(-30/+60) presentaron un decremento del 54.4% en el número de neuronas dañadas por campo comparado con el grupo con QUIN (Figura 15, panel inferior).



**Figura 15.** Efecto de la apocinina (APO) sobre el daño neuronal inducido por el QUIN en el estriado de rata. Los animales recibieron APO (5 mg/kg i.p.) o solución salina, 30 min antes y 1 h después de la infusión con QUIN (240 nmol/ $\mu$ l) [QUIN + APO(-30/+60)] o 30 min después del QUIN [QUIN + APO(+30)]. Los cortes fueron de 6  $\mu$ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se observaron con un aumento de 40x. La imagen superior muestra una fotomicrografía representativa del grupo control (CT), QUIN, QUIN + APO(-30/+60), y QUIN + APO(+30). Se señalan los núcleos picnóticos (puntas de flechas), edema en el neurópilo intersticial (asteriscos) y núcleos hinchados (flechas). El gráfico muestra el daño celular representativo cuantificado 7 días después de la inyección con el QUIN. Los resultados son la media  $\pm$  SEM (n=5). <sup>a</sup>P < 0.001 vs los grupos CT y QUIN + APO(-30/+60). <sup>b</sup>P < 0.001 contra los grupos CT y QUIN + APO(+30). <sup>c</sup>P < 0.05 contra el grupo CT.

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Actualmente no hay una terapia efectiva para prevenir las alteraciones conductuales y fisiológicas de los pacientes que sufren la enfermedad de Huntington por lo que es necesario que se realicen más estudios para encontrar terapias farmacológicas para mejorar la calidad de vida de estos pacientes. En este sentido, el modelo fenotípico de la enfermedad de Huntington inducido por una inyección intraestriatal de QUIN (Schwarcz *et al.*, 1983) ha sido de gran utilidad no sólo como un acercamiento a la fisiopatología de la enfermedad, sino también para evaluar muchas de las herramientas farmacológicas para atenuar las alteraciones bioquímicas y conductuales de esta enfermedad. El QUIN es un agonista glutamatérgico que actúa sobre la subunidad Nr2b de los receptores N-metil-D-aspartato cuya sobreactivación conlleva a una cascada de eventos como la excitotoxicidad y el estrés oxidante que participa en la muerte celular. La excitotoxicidad favorece la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas, lo cual a su vez activa muchos de los procesos que conllevan al estrés oxidante y nitrante (Stipek *et al.*, 1997; Behan *et al.*, 1999; Santamaría *et al.*, 2003 a,b; Perez-De la Cruz *et al.*, 2005). Además, el QUIN por si mismo puede formar complejos con Fe(II) y entonces puede generar radicales hidroxilo en el estriado (Santamaría *et al.*, 2001). También se ha informado que el QUIN disminuye la capacidad endógena antioxidante (Perez-De La Cruz *et al.*, 2005; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000). Es el presente trabajo se remarca el proceso oxidante como una parte integral de la toxicidad producida por el QUIN y la contribución de la NADPH oxidasa en este proceso tóxico generado en este modelo.

Se ha propuesto que una de las principales fuentes extramitocondriales de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es la NADPH ox (Orient *et al.*, 2007). Se ha documentado la participación de la NADPH ox en la muerte neuronal en modelos

experimentales de la enfermedad de Alzheimer (Shimohama *et al.*, 2000; Abramov *et al.*, 2004; Jana and Pahan, 2004; Hashimoto *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2005; Abramov y Duchon, 2005; Park *et al.*, 2005; Shelat *et al.*, 2008) y en la enfermedad de Parkinson (Gao *et al.*, 2003a; b; 2003; Wu *et al.*, 2003; Block *et al.*, 2004; Casajeros *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007; Joglar *et al.*, 2009). En contraste, el papel de la NADPH ox en los modelos experimentales de la enfermedad de Huntington ha sido poco estudiado. Por lo que en el presente estudio se evaluó si la administración intraestriatal de QUIN incrementa la actividad de la NADPH ox. Además, para aclarar el papel del complejo enzimático en este modelo experimental, se empleó la APO, un inhibidor específico de la NADPH ox (Stefanska y Pawliczak, 2008).

Se emplearon dos esquemas de administración de la APO. En el primero la apocinina se administró como un tratamiento profiláctico: 30 min antes y 1 h después de la inyección del QUIN; en el segundo esquema, la APO se inyectó como un agente terapéutico: después de 30 min de la inyección del QUIN. En ambos esquemas, la APO redujo significativamente las alteraciones sobre la conducta rotatoria inducidas por el QUIN; sin embargo, los cambios morfológicos se previnieron únicamente con las dos administraciones de la APO. Esto es particularmente relevante ya que el comportamiento y los cambios morfológicos pueden ser considerados como dos índices de fisiología alterada. En este aspecto el efecto protector de la APO fue más evidente cuando se dio como un agente profiláctico. Estos hallazgos demuestran que la activación de la NADPH ox juega un papel importante en la neurodegeneración inducida por QUIN.

Para confirmar el papel de la NADPH ox en este modelo experimental, la producción de  $O_2^{\bullet-}$  se evaluó en homogenados de estriado provenientes de animales tratados con QUIN que recibieron APO. Se encontró que el

QUIN incrementó la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , y que este efecto se previno por la administración *in vivo* de la APO. La disminución de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  fue ligeramente mayor cuando la APO se dio como un agente profiláctico. Además, la administración *in vivo* de la APO disminuyó la producción de  $O_2^{\bullet-}$  aún por debajo de los valores del grupo control. Estas evidencias respaldan una participación activa de la NADPH ox en la producción intraestriatal de  $O_2^{\bullet-}$  inducida por el QUIN. Para corroborar la participación de la NADPH ox como responsable de la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , los homogenados de estriado se incubaron con NADH, el sustrato de la enzima, lo que aumentó aún más la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en los tejidos de estriado de los animales tratados con QUIN. Estos resultados demuestran que la NADPH ox es una fuente importante de  $O_2^{\bullet-}$ . Para corroborar aún más este paradigma, los homogenados se incubaron en presencia de inhibidores de la NADPH ox (APO y DPI), los cuales lograron bloquear la generación de  $O_2^{\bullet-}$  inducida por el NADH. Finalmente, la potencial contribución de otras fuentes de  $O_2^{\bullet-}$  en los tejidos lesionados por el QUIN se puso a prueba cuando se adicionó xantina, succinato o L-arginina a los homogenados de ratas tratadas con QUIN y no se observó ningún aumento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  a las 2 h. Estos datos sugieren que la xantina oxidasa, la mitocondria y la óxido nítrico sintasa no contribuyen de manera significativa al tiempo en el que se llevó a cabo el experimento.

Un incremento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  es relevante, en la medida de que este radical puede ser el precursor para otras formas más oxidantes, como el peroxinitrito, el peróxido de hidrógeno y el  $\cdot OH$  (Babior, 2004). En este contexto, la activación de la NADPH oxidasa en un ambiente prooxidante inducido por el QUIN está también respaldado por el efecto que la APO exhibe sobre la formación de lípidos oxidados. La administración de APO fue capaz de atenuar el daño oxidante a los

lípidos, sugiriendo que la inhibición de la NADPH oxidasa participa activamente para la prevención de estrés oxidante inducido por el QUIN.

## **6. CONCLUSIONES**

1. El daño neuronal producido por el QUIN en el estriado de ratas involucra la sobreactivación de la NADPH oxidasa.
2. La NADPH oxidasa es la principal fuente de  $O_2^{\bullet-}$  en el proceso de neurodegeneración inducido por QUIN, al tiempo estudiado.
3. La NADPH oxidasa al ser sobreactivada genera un aumento temprano en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en el cerebro que conlleva a un estado oxidante, que aunado a la excitotoxicidad generada por el QUIN produce daños mortales a células neuronales.
4. La APO funciona como un inhibidor de la NADPH oxidasa y por lo tanto disminuye los efectos tóxicos observados a nivel conductual y neuronal producidos por la sobreactivación de la NADPH oxidasa.
5. Al estar involucrada la NADPH oxidasa de manera importante en el daño neuronal, puede ser un blanco terapéutico para los pacientes que padecen la enfermedad de Huntington.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates PG, Lin SC, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H, Altherr M, Wasmuth J, Buckler A, Church D, Housman D, Berks M, Micklem G, Durbin R, Dodge A, Read A, Gusella J, MacDonald ME. 1994. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 20:27-38.

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. 2004.  $\beta$ -Amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci* 24:565-575.

Abramov AY, Duchen MR. 2005. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2309-2314.

Atkins CM, Sweatt JD. 1999. Reactive oxygen species mediate activity-dependent neuron-glia signaling in output fibers of the hippocampus. *J Neurosci* 19:7241-7248.

Babior BM. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.

Babior BM. 2004. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16:42-47.

Babior BM, Takeuchi C, Ruedi JM, Gutierrez A, Wentworth P Jr. 2003. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci* 100:3031-3034.



Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.

Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, Colli S. 2004. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med* 37:156-165.

Batot G, Martel C, Capdeville N, Wientjes F, Morel F. 1995. Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem* 234:208-215.

Behan WM, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. 1999. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol* 128:1754-1760.

Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC. 2001. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* 276:31105-31112.

Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E. 2003. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23: 5020-5030.

Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. 1991. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 11:1649-1659.

Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.

Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX Family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.

Belladonna ML, Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, Gizzi S, Pallotta MT, Fioretti MC, Grohmann U. 2007. Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* 84:S17-S20.

Block ML, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, Wilson B, Yang J, Hong JS, Veronesi B. 2004. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J* 18:1618-1620.

Bondy SC. 1989. Intracellular calcium and neurotoxic events. *Neurotoxicol Teratol* 11:527-531.

Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, Saudou F. 2006. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63:2642-2660.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24:471-478.

Casarejos MJ, Menéndez J, Solano RM, Rodríguez-Navarro JA, García de Yébenes J, Mena MA. 2006. Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J Neurochem* 97:934-946.

Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. 2005. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6:919-930.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. 2001. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of NOX3, NOX4, and NOX5. *Gene* 269:131-140.

Choi, DW. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.

Choi SH, Lee DY, Chung ES, Hong YB, Kim SU, Jin BK. 2005. Inhibition of thrombin-induced microglial activation and NADPH oxidase by minocycline protects dopaminergic neurons in the substantia nigra in vivo. *J Neurochem* 95:1755-1765.

Chrissobolis S, Faraci FM. 2008. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med* 14:495-502.

Crabb JW, O'Neil J, Miyagi M, West K, Hoff HF. 2002. Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues. *Protein Sci* 11:831-840.

Cross AR, Rae J, Curnutte JT. 1995. Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J Biol Chem* 270:17075-17077.

Cross AR, Segal AW. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657:1-22.

Damiano M, Galvan L, Déglon N, Brouillet E. 2010. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802:52-61.

Davies, SW y Roberts PJ. 1988. Sparing of cholinergic neurons following quinolinic acid lesions of the rat striatum. *Neuroscience* 26:387-393.

De Carvalho LP, Bochet P, Rossier J. 1996. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunit. *Neurochem* 28:445-452.

Dodd-o JM, Pearse DB. 2000. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol* 279:H303-H312.

Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.

Dunnett SB, Svendsen CN. 1993. Huntington's disease: animal models and transplantation repair. *Curr Opin Neurobiol* 3:790-796.

Dugan LL, Kim-Han JS. 2006. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, *Basic Neurochemistry*, 7th ed. Elsevier Academic Press. Burlington, MA, pp. 559-573.

Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. 2008. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 60:21-28.

Eastman CL, Guilarte TR. 1989. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. *Brain Res* 495:225-231.

Estrada-Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res* 39:265-276.

Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP Jr. 1987. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:12-27.

Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP Jr, Bird ED, Martin JB. 1985. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230:561-563.

Ferrante RJ. 2009. Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim Biophys Acta* 1792:506-520.

Ferrante RJ, Beal MF, Kowall NW, Richardson EP Jr, Martin JB. 1987. Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res* 411:162-166.

Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF. 1993. Excitotoxic lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 119:46-71.

Foster AC, Collins JF, Schwarcz R. 1983. On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology* 22:1331-1342.

Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett* 48:273-278.

Gafni J, Ellerby LM. 2002. Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* 22:4842-4849.

Gafni J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM. 2004. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* 279:20211-20220.

Gao HM, Liu B, Hong JS. 2003a. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23:6181-6187.

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. 2003b. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J* 17:1954-1956.

Garthwaite G, Hajos F, Garthwaite J. 1986. Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 18:437-447.

Garthwaite G, Garthwaite J. 1987. Quinolinate mimics neurotoxic actions of N-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices. *Neurosci Lett* 79:35-39.

Geiszt M, Kapus A, Ligeti E. 2001. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *J Leukoc Biol* 69:191-196.

Gissi C, Pesole G, Cattaneo E, Tartari M. 2006. Huntingtin gene evolution in Chordata and its peculiar features in the ascidian *Ciona* genus. *BMC Genomics* 7:288.

González A, Varo N, Alegre E, Diaz A, Melero I. Immunosuppression routed via the kynurenine pathway: a biochemical and pathophysiologic approach. *Adv Clin Chem* 2008 45:155-197.

Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR. 2006. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal

dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125:1179-11791.

Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227:770-773.

Groemping Y, Rittinger K. 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386:401-416.

Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. 2004. Neostriatal and cortical quinolate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobio of dis* 17:455-461.

Harper SP. 1991. Huntington's Disease. Philadelphia: W.B. Saunders; pp. 127-141.

Hart BA, Simons JM, Knaan-Shanzer S, Bakker NPM, Labadie RP. 1990. Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free Radical Bio Med* 9:127-131.

Hart BA, Simons JM, Rijkers GT, Hoogvliet JC, Van Dijk H, Labadie RP. 1990. Reaction products of 1-naphthol with reactive oxygen species prevent NADPH oxidase activation in activated human neutrophils, but leave phagocytosis intact. *Free Radic Biol Med* 8:241-249.

Hashimoto Y, Chiba T, Yamada M, Nawa M, Kanekura K, Suzuki H, Terracita K, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. 2005. Transforming growth factor b2 is a neuronal death-inducing ligand for amyloid-b precursor protein. *Mol Cell Biol* 25:9304-9317.



Heyes MP, Swartz KJ, Markey SP, Beal MF. 1991. Regional brain and cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 122:265-269.

Heyes MP, Garnett ES, Brown RR. 1985. Normal excretion of quinolinic acid in Huntington's disease. *Life Sci* 37:1811-1816.

Holland JA. 1999. Prevention of atherosclerosis using NADPH oxidase inhibitors. US patent no. 5902831.

Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YMF, Hoijer MA, Garssen J, van der Berg W, van Beuningen HM, Smit HF. 2006. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 531:264-269.

Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971-983.

Jana A, Pahan K. 2004. Fibrillar amyloid- $\beta$  peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:51451-51459.

Joglar B, Rodríguez-Pallares J, Rodríguez-Pérez A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-García JL. 2009. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem* 109:656-669.

Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, O'Donnell RW, Chang MM, Hogg MG, Dordick JS, Santhanam L, Ziegler LM, Holland JA. 2002. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by orthomethoxy-substituted catechols. *Endothelium* 9:191-203.

Kanegae MP, da Fonseca LM, Brunetti IL, Silva SO, Ximenes VF. 2007. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. *Biochem Pharmacol* 74:457-464.

Kawahara T, Lambeth JD. 2007. Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evol Biol* 7:178.

Kim JP, Choi DW. 1987. Quinolate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 23:423-432.

Kim YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N, DiFiglia M. 2001. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci* 98:12784-12789.

Klöppel S, Henley SM, Hobbs NZ, Wolf RC, Kassubek J, Tabrizi SJ, Frackowiak RS. 2009. Magnetic resonance imaging of huntington's disease: Preparing for clinical trials. *Neuroscience* 164:205-219.

Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri, F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, Bird TD, Hayden MR. 1994. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 330:1401-1406.

Lafeber FPJG, Beukelman CJ, van den Worm E, van Roy JLAM, Vianen ME, van Roon JAG, van Dijk H, Bijlsma JWJ. 1999. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38:1088-1093.

Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.

Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. 2007. Regulation of NOX and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 43:319-331.

Lapin IP. 1982. Convulsant action of intracerebroventricularly administered L-kynurenine sulphate, quinolinic acid and other derivatives of succinic acid, and effects of amino acids: structure-activity relationships. *Neuropharmacology* 21:1227-1233.

Le Cabec V, Maridonneau-Parini I. 1995. Complete and Reversible Inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a step distal to membrane translocation of the enzyme subunits. *J Biol Chem* 270:2067-2073.

Lee MY, Griending KK. 2008. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid. Redox Signal* 10:1045-1059.

Leto TL, Adams AG, de Mendez I. 1994. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci* 91:10650-10654.

Liochev SI, Fridovich I. 2007. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *Free Radic Biol Med* 42:1465-1469.

Lo W, Bravo T, Jadhav V, Titova E, Zhang JH, Tang J. 2007. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcomes in surgically-induced brain injury. *Neurosci Lett* 414:228-232.

Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. 2008. Dose formulation and analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem* 56:301-306.

Lyle AN, Griendling KK. 2006. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 21:269-280.

McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. 1988. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res* 459:200-203.

Migliore y Copedè. 2009. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res* 674:73-84.

Miller RL, Sun GY, Sun AY. 2007. Cytotoxicity of paraquat in microglial cells: involvement of PKC $\delta$ - and ERK1/2-dependent NADPH oxidase. *Brain Res* 1167:129-139.

Monaghan DT, Beaton JA. 1991. Quinolinate differentiates between forebrain and cerebellar NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 194:123-125.

Mora-Pale M, Weïwer M, Yu J, Linhardt RJ, Dordick JS. 2009. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols. *Bioorg Med Chem* 17:5146-5152.

Moroni F, Grazia L, Gloriano M. 1984a. The excitotoxin QA is present in the brain of several Mammals and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett* 47:51-55.

Moroni F, Lombardi G, Carlà V, Moneti G. 1984b. The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res* 295:352-355.

Myers RH, Vonsattel JP, Stevens TJ, Cupples LA, Richardson EP, Martin JB, Bird ED. 1988. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38:341-347.

Nadler JV, Evenson DA, Cuthbertson GJ. 1981. Comparative toxicity of kainic acid and other acidic amino acids toward rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 6:2505-2517.

Orient A, Donkó A, Szabó A, Leto TL, Geiszt M. 2007. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant* 22:1281-1288.

Paravicini TM, Touyz RM. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31:S170-S180.

Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitstick R, Younkin S, Carlson GA, Iadecola C. 2005. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid b peptide. *J Neurosci* 25:1769-1777.

Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. 2004. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res* 77:540-551.

Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.

Petersen A, Bjorkqvist M. 2006. Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease. *Eur J Neuro Sci* 24:961-967.

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 135:463-474.

Pérez-Severiano F, Rodríguez-Perez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortíz-Plata A, Sanchez-García A, Villeda-Hernandez J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A. 2004. S-allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45:1175-1183.

Pláteník J, Stopka P, Vejrazka M, Stípek S. 2001. Quinolinic acid-iron(II) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction. *Free Radic Res* 34:445-459.

Qian L, Xu Z, Zhang W, Wilson B, Hong JS, Flood PM. 2007. Sinomenine, a natural dextrorotatory morphinan analog, is anti-inflammatory and neuroprotective through inhibition of microglial NADPH oxidase. *J Neuroinflammation* 4:23.

Quinn MT, Gauss KA. 2004. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 76:760-781.

Rasmussen A. Huntington infantil y juvenil. In: Mateos Gómez H, ed. *Enfermedad de Huntington "Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez"*. México, DF: 2000. pp. 22-27.

Reiner A, Dragatsis I, Zeitlin A, Goldowitz D. 2003. Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Mol Neurobiol* 28:259-276.

Reynolds GP, Pearson SJ, Halket J, Sandler M. 1988. Brain quinolinic acid in Huntington's disease. *J Neurochem* 50:1959-1960.

Rios C, Santamaria A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* 16:1139-1143.

Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436-439.

Ruocco HH, Lopes-Cendes I, Li LM, Santos-Silva M, Cendes F. 2006. Striatal and extrastriatal atrophy in Huntington's disease and its relationship with length of the CAG repeat. *Braz J Med Biol Res* 39:1129-1136.

Salmon M, Koto H, Lynch OT, Haddad E, Lamb NJ, Quinlan GJ, Barnes PJ, Chung KF. 1998. Proliferation of airway epithelium after ozone exposure: effect of apocynin and dexamethasone. *Am J Resp Crit Care* 157:970-977.

Santamaría A, Flores-Escartín A, Martínez JC, Osorio L, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Jiménez-Capdeville ME, Manjarrez J, Ríos C. 2003a. Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radic Biol Med* 35:418-427.

Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12:2693-2696.

Santamaría A, Ríos C. 1993. MK-801, an NMDA receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159:51-54.



Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Roman B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville ME, Ali SF. 2003b. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 86:479-488.

Sassone J, Colciago C, Cislighi G, Silani V, Ciammola A. 2009. Huntington's disease: The current state of research with peripheral tissues. *Exp Neurol* 219:385-397.

Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N. 2005. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F1144-F1152.

Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Nunomura A, Chiba S, Perry G, Smith MA, Fujimoto S. 2000. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun* 273:5-9.

Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL. 1998. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22:1217-1240.

Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY. 2008. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106:45-55.

Schiefer J, Alberty A, Dose T, Oliva S, Noth J, Kosinski CM. 2002. Huntington's disease transgenic mice are resistant to global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 334:99-102.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. 2009. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 90:230-245.

Schwarcz R, Whetsell WO, Jr, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-318.

Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell Jr, NO, Kohler C. 1984. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 95:29-38.

Segal AW, Garcia R, Goldstone AH, Cross AR, Jones OTG. 1981. Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J* 196:363-367.

Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, Kemp-Harper BK, Drummond GR. 2007. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 75:349-358.

Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E. 2003. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 988:193-198.

Shi J, Ross CR, Leto TL, Blecha F. 1996. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci* 93:6014-6018.

Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. 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.

Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP. 1990. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 8:251-258.

Stefanska J, Pawliczak R. 2008. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* 2008:1-10.

Stípek S, Stastný F, Pláteník, J., Crkovská, J, Zima T. 1997. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem Int* 30:233-237.

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:95-102.

Stone TW, Perkins MN. 1981. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72:411-412.

Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem* 267:13425-13433.

Sumimoto H. 2008. Structure, regulation and evolution of NOX-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275:3249-3277.

Sun GY, Horrocks LA, Farooqui AA. 2007. The roles of NADPH oxidase and phospholipases A(2) in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 103:1-16.

Tang LL, Ye K, Yang XF, Zheng JS. 2007. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *J Int Med Res* 35:517-522.

Vilhardt F, Plastre O, Sawada M, Suzuki K, Wiznerowicz M, Kiyokawa E, Trono D, Krause KH. 2002. The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 277:42136-42143.

Wang Q, Tompkins KD, Simonyi A, Korthuis RJ, Sun AY, Sun GY. 2006. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 1090:182-189.

Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE Jr, Ford PC. 1994. The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci* 91:6604-6608.

Wolfensberger M, Amsler U, Cuénod M, Foster AC, Whetsell WO, Jr, Schwarcz R. 1983. Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett* 41:247-252.

Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. 2003. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci* 100:6145-6150.

Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, Galhiane MS. 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys* 457:134-141.

Zheng JS, Zhan RY, Zheng SS, Zhou YQ, Tong Y, Wan S. 2005. Inhibition of NADPH oxidase attenuates vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 36:1059-1064.