



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO EN UN MODELO  
DE DEGENERACIÓN ESTRIATAL**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**ANGÉLICA CANTERO TÉLLEZ**

**TUTORA: ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**  
**DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA,**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**  
**DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO,**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO (FES  
IZTACALA), SEPTIEMBRE, 2023**



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.



## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por aceptarme en su laboratorio y por toda la enseñanza brindada durante los experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova y la Dra. María de la Luz Navarro Angulo por el apoyo que me brindaron para la realización de este proyecto. En especial a la Dra. Rodríguez Córdova que me permitió realizar los experimentos para obtener niveles de dopamina y serotonina en su laboratorio.

Gracias a la Dra. Leticia Moreno Fierros y al Dr. Ángel de Jesús Jiménez Chávez por capacitarme en la técnica de ELISA.

Gracias a la Dra. Miriam Rodríguez Sosa y a la Técnico académico M. en C. Imelda Juárez Avelar por brindarme la capacitación adecuada para realizar los experimentos de transaminasas.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y a la Técnico académico Dra. Margarita Gómez Chavarín por el apoyo en la realización de los experimentos de lipoperoxidación.

De manera especial quiero agradecer al Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez y a la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por la guía que me dieron al realizar esta tesis y todo el apoyo brindado para analizar los resultados estadísticos de este trabajo.

Gracias al técnico académico M. en C. Ernesto Mendoza Duarte<sup>†</sup> por su ayuda en la enseñanza y realización de los experimentos.

A la técnico académico Dra. Elizabeth Nieto Mendoza por compartir tu trabajo y conocimientos que han ayudado a la realización de este trabajo.



Al técnico académico Biol. María Soledad Mendoza Trejo por la ayuda brindada en la realización de los experimentos de dopamina y serotonina.

Gracias al Dr. Francisco Miguel Torres Cruz por la enseñanza brindada durante la realización de los experimentos de ELISA y el manejo de proteínas.

Gracias al posgrado Maestría en Ciencias Neurobiología por brindarme la oportunidad de realizar el posgrado y a la Dra. Nuri Aranda López por todo el apoyo administrativo y académico brindado durante la realización de la maestría.

Gracias a CONACyT por la beca para realizar la Maestría con número de registro 822808

A la UNAM por la beca brindada por medio del programa DGAPA-PAPIIT a través del proyecto IN21672



## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por darme la oportunidad de ser parte de la familia de trabajo del laboratorio, pero más allá de eso por la paciencia y apoyo que me ha brindado. Gracias por guiarme en esta parte de mi vida y ser el ejemplo a seguir. Gracias por enseñarme que esto es mucho más que solo una maestría... que esto es mi proyecto de vida.

Gracias al Maestro en Ciencias Ernesto Mendoza Duarte<sup>†</sup> por invertir parte de tu vida para que pudiera crecer profesionalmente, gracias por tus consejos y amistad que me brindaste, siempre estás presente en mi corazón.

A mi papito Juan Antonio Cantero Quezada por siempre ser mi compañero y darme tu apoyo incondicional, gracias por todo el amor y sabios consejos que me has dado, porque nunca has perdido la fe en mí y mi trabajo. Gracias por recordarme que no hay que quitar el dedo del renglón para lograr lo que quiero.

Gracias a mi mamá María del Carmen Téllez García y a mi hermana Elizabeth Alicia Cantero Téllez por no perder la esperanza de que lograré mis sueños, gracias por ser pacientes.

Gracias a mi segunda familia, mis compañeros de laboratorio, al Dr. Francisco Miguel Torres Cruz, al M. en C. Daniel Alonso Villarreal y a la Dra. Elizabeth Nieto Mendoza, por todas las risas, lágrimas y tiempo compartido. Gracias por que siempre logran darle alegría y felicidad a mis días. Ustedes han sido mi constante apoyo para lograr lo que quiero y me han enseñado que todo en equipo es mejor.

Gracias al super team: los maestros en ciencias de neurobiología Esmeralda Cardona, María de Lourdes Álvarez y Carlos Rosales por ser justo los nuevos amigos que necesitaba en mi vida.



Gracias a mi persona la M. en Ciencias Yumara Liliana Martínez Yllescas porque, aunque en lugares separados seguimos caminando juntas de la mano con toda nuestra complicidad, amor y apoyo incondicional. ¡Lo logramos juntas!

Finalmente, a mi esposo el Dr. Ángel de Jesús Jiménez Chávez porque hace 6 años me propuse hacer realidad esto y nunca dudaste que lo lograría. Nuestro constante crecimiento ha sido gracias a todo lo que hemos construido juntos, gracias por las noches de desvelo y por la infinita paciencia, amor y amistad que me das día a día, minuto a minuto.



## DEDICATORIAS

A mi hijo **Diego Ángel Jiménez Cantero**

Porque nada ni nadie me ha enseñado tanto  
en la vida como tú lo has hecho.



“Los mediocres pueden ser educados;  
los genios se educan así mismos.”  
Santiago Ramón y Cajal.





## RESUMEN

El estriado forma parte de los ganglios basales del sistema nervioso central y se encarga de regular los movimientos voluntarios, la degeneración de sus componentes neuronales conduce al desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas.

Un modelo utilizado para el estudio de las alteraciones que ocurren durante la neurodegeneración del estriado es el generado mediante el uso del ácido 3 nitropropiónico (3-NP), el cual bloquea al complejo II mitocondrial acarreado excitotoxicidad, estrés oxidante, etc. El uso de antioxidantes ha mostrado la capacidad de evitar y/o prevenir los cambios que se presentan durante la neurodegeneración. Un flavonoide antioxidante que encontramos en abundancia en alimentos de consumo diario y que parece tener propiedades neuroprotectoras es el ácido clorogénico (CGA), el cual se ha reportado disminuye marcadores apoptóticos promovidos por estrés oxidante, aumenta la capacidad cognitiva, regula neuromoduladores como la dopamina y disminuye marcadores tóxicos y genotóxicos en modelos *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneración. Por lo que en el presente estudio nos propusimos demostrar la capacidad neuroprotectora del CGA en un modelo de degeneración estriatal promovido por el 3-NP.

Para cumplir con el objetivo medimos lipoperoxidación, citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) y antiinflamatorias (IL-2 e IL-4), transaminasas y el neuromodulador dopamina y sus metabolitos.

Como resultados encontramos que el CGA disminuye la peroxidación lipídica en estriado y corteza frontal, además de disminuir IL-6 y aumentar las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-2 en estriado y corteza, sumado a esto también observamos que el CGA modula los niveles de dopamina en corteza frontal

Debido al uso creciente del CGA por sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, para bajar de peso, antitumorales, antihipertensivos, en la mejora de los trastornos metabólicos y efectos protectores del tracto intestinal y que esto puede ser benéfico para las enfermedades neurodegenerativas, nosotros



proponemos el uso de CGA para prevenir y evitar la neurodegeneración estriatal y de la corteza frontal que puede ser ocasionada por procesos de inflamación y de estrés oxidante.



## ABSTRACT

The striatum is part of the basal ganglia of the central nervous system and is responsible for regulating voluntary movements, the degeneration of its neuronal components leads to the development of various neurodegenerative diseases.

A model used to study the alterations that occur during striatal neurodegeneration is through the use of 3-nitropropionic acid (3-NP), which blocks mitochondrial complex II, causing excitotoxicity, oxidative stress, etc. The use of antioxidants has shown the ability to avoid and/or prevent the changes that occur during neurodegeneration, an antioxidant flavonoid that we find in abundance in daily consumed foods and that seems to have neuroprotective properties is chlorogenic acid (CGA), the which has been reported to decrease apoptotic markers promoted by oxidative stress, increase cognitive capacity, regulate neuromodulators such as dopamine, and decrease toxic and genotoxic markers in in vitro and in vivo models of neurodegeneration. Therefore, in the present study we set out to demonstrate the neuroprotective capacity of CGA in a model of striatal degeneration promoted by 3-NP.

The aim of this work was to measure we measured lipid peroxidation, proinflammatory (TNF- $\alpha$ , and IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-2 and IL-4), transaminases, and the neuromodulator dopamine and its metabolites.

As results, we found that CGA decreases lipid peroxidation in the striatum and frontal cortex, in addition to decreasing IL-6 and increasing the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-2 in the striatum and cortex, added to this we also observed that CGA modulates the dopamine levels in frontal cortex

Due to the increasing use of CGA for its antioxidant, anti-inflammatory, weight loss, antitumor, antihypertensive effects, in improving metabolic disorders and protective effects of the intestinal tract and that this may be beneficial for neurodegenerative diseases, we propose the use of CGA to prevent and avoid striatal neurodegeneration and frontal cortex that can be caused by processes of inflammation and oxidative stress.



## Índice

RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. SISTEMA NERVIOSO .....</b>	<b>14</b>
1.1.1. Ganglios basales .....	15
1.1.2. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN .....	18
1.1.2.1. Neurotransmisores rápidos.....	18
1.1.2.2. Monoaminas: Dopamina (DA) .....	18
<b>1.2 NEURODEGENERACIÓN: MODELOS DE ESTUDIO (ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO).....</b>	<b>21</b>
1.2.1. Disfunción mitocondrial y estrés oxidante .....	21
1.2.2. Efectos sistémicos del 3-NP.....	25
1.2.3. Inflamación.....	26
<b>1.3 ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>27</b>
1.3.1 Ácido clorogénico (CGA) .....	28
<b>2.0. Justificación .....</b>	<b>31</b>
<b>3.0. Hipótesis.....</b>	<b>31</b>
<b>4.0. Objetivos .....</b>	<b>32</b>
4.1. Objetivo General.....	32
4.2. Objetivos particulares.....	32
<b>5.0. Diseño experimental.....</b>	<b>33</b>
<b>6.0. Resultados .....</b>	<b>36</b>
6.1. Peso corporal .....	36
6.2. Peso del hígado .....	38
6.3. Transaminasas.....	39
6.4. Lipoperoxidación .....	40
6.5. Citocinas.....	41
6.5.1. TNF- $\alpha$ .....	41
6.5.2. IL-6.....	43
6.5.3. IL-2.....	44
6.5.4. IL-4.....	46
6.6. Concentración de neurotransmisores monoaminérgicos .....	48



6.6.1.	Concentraciones de dopamina y sus metabolitos.....	48
6.6.2.	Concentraciones de serotonina y su metabolito.....	50
7.0.	Discusión.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	58
9.	PERSPECTIVAS.....	59
10.	APENDICE 1.....	60
11.	Referencias.....	61



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **3-NP** = ácido 3 nitropropiónico
- **5-HIAA** = ácido 5-hidroxiindolacético
- **5-HT** = serotonina
- **5-HTP** = 5-hidroxitriptófano
- **8-OHdG** = 8-hidroxi-deoxiguanosina
- **Ca<sup>2+</sup>** = Calcio
- **CGA** = Ácido clorogénico
- **DA** = Dopamina
- **DOPAC** = 3,4-dihidroxifenilacético
- **DOPAL** = 3,4-dihidroxifenilacetaldehído
- **ELISA** = Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima
- **EH** = Enfermedad de Huntington
- **GABA** = ácido-γ-aminobutírico
- **GPe** = globo pálido externo
- **GPI** = globo pálido interno
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** = Peróxido de hidrógeno
- **HPLC** = Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
- **HVA** = Ácido homovanílico
- **IL** = interleucina
- **i.p.** = intraperitoneal
- **Kg** = kilogramo
- **MAO** = Monoamina oxidasa
- **MDA** = Malondialdehído
- **mg** = miligramo
- **NEM** = neuronas espinosas medianas
- **NF-κB** = Factor nuclear κB
- **ng** = nanogramos
- **PBS** = Buffer de fosfatos
- **PC-12** = células de feocromocitoma 12
- **pg** = picogramos
- **SDH** = succinato deshidrogenasa
- **SERT** = transportador de serotonina
- **SN** = sistema nervioso
- **SNc** = sustancia nigra pars compacta
- **SNr** = sustancia nigra pars reticulata
- **SNA** = sistema nervioso autónomo
- **STN** = núcleo subtalámico
- **TBARS** = sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico
- **TNF-α** = Factor de necrosis tumoral α
- **VA** = ventral anterior
- **VL** = ventral lateral



## ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Organización general de las estructuras neuronales ..... 15
- **Figura 2.** Sección coronal del cerebro donde se observan los ganglios basales..... 16
- **Figura 3.** Vía directa e indirecta del control del movimiento mediado por el estriado..... 17
- **Figura 4.** Síntesis de dopamina..... 19
- **Figura 5.** Estructura molecular del 3-NP y el ácido succínico..... 23
- **Figura 6.** Alteraciones moleculares promovidas por el bloqueo del complejo dos mitocondrial con 3-NP..... 24
- **Figura 7.** Estructura molecular del Ácido clorogénico.....29

## RESULTADOS

- **Figura 8.** Peso corporal..... 36
- **Figura 9.** Peso del hígado..... 37
- **Figura 10.** Transaminasas..... 38
- **Figura 11.** Lipoperoxidación..... 39
- **Figura 12.** Concentraciones de TNF- $\alpha$  en estriado y corteza frontal ..... 41
- **Figura 13.** Concentraciones de IL-6 en estriado y corteza frontal..... 42
- **Figura 14.** Concentración de IL-2 en estriado y corteza frontal..... 44
- **Figura 15.** Concentraciones de IL-4 en estriado y corteza frontal..... 45
- **Figura 16.** Concentración de dopamina en estriado y corteza frontal.....47
- **Figura 17.** Concentración de serotonina en estriado y corteza frontal.....49



# 1. INTRODUCCIÓN

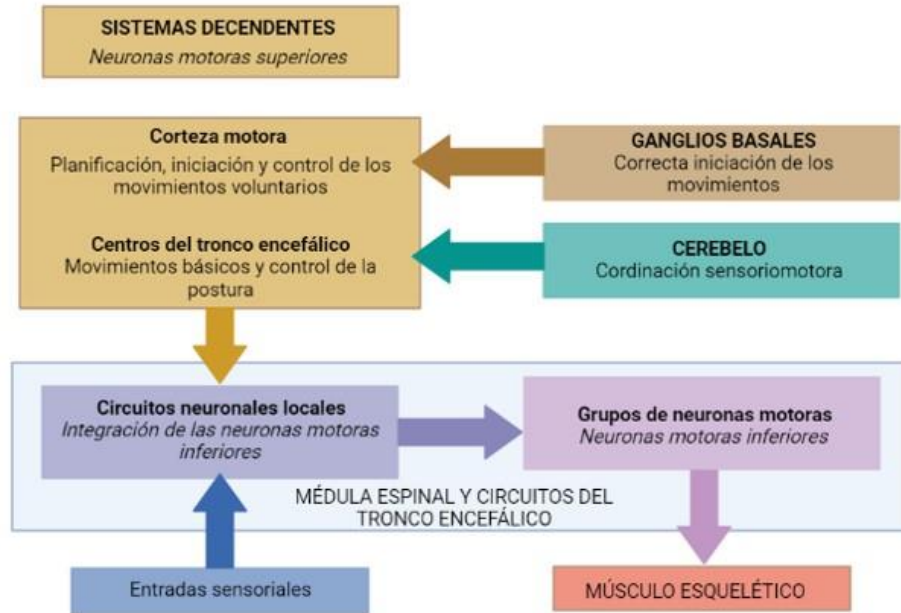
## 1.1. SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso (SN) está constituido por un grupo de estructuras conformadas principalmente por circuitos neuronales complejos que se encargan de regular numerosas funciones como la propiocepción, el aprendizaje, la memoria, el movimiento, entre otras. Uno de los circuitos neuronales más importantes es el del control de las funciones motoras, ya que el movimiento es parte de las acciones esenciales para diversos organismos (Purves et al., 2004).

Los movimientos se pueden dividir en voluntarios e involuntarios, ambos son generados por contracciones musculares y la acción coordinada del sistema músculo-esquelético, todo ello dirigido por el cerebro, el tronco encefálico y la médula espinal. Los movimientos involuntarios se generan por la contracción del músculo liso en los órganos viscerales y son dirigidos por el sistema nervioso autónomo (SNA), mientras que, los movimientos voluntarios son iniciados por neuronas motoras inferiores que inervan al músculo esquelético y que se encuentran en la médula espinal y en el tronco encefálico. Las motoneuronas inferiores son controladas de manera directa por circuitos locales dentro de la médula espinal y el tronco encefálico y coordinan grupos de músculos individuales. De manera indirecta las motoneuronas inferiores están controladas por motoneuronas superiores en centros superiores que controlan circuitos locales, coordinando secuencias complejas de movimientos (Purves et al., 2004) (Figura 1).

Dentro de los circuitos locales superiores que controlan las secuencias de movimientos complejos se encuentran el cerebelo y los ganglios basales, los cuales regulan a las motoneuronas superiores, quienes a su vez envían la señalización adecuada a las neuronas motoras inferiores para asegurar que los movimientos sean ejecutados con precisión temporal y espacial por parte del músculo esquelético (Purves et al., 2004) (Figura 1).

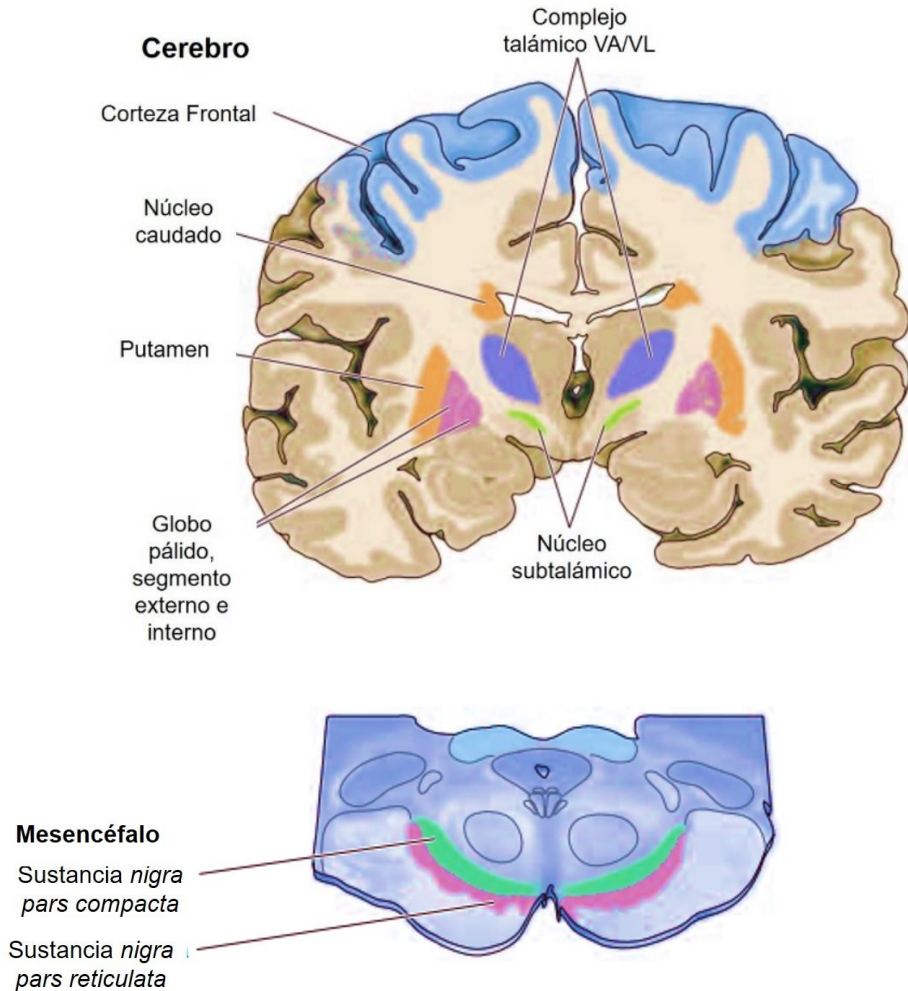




**Figura 1.** Organización general de las estructuras neuronales. Se muestran las estructuras neuronales involucradas en el control de los movimientos. Modificado de Purves et al., (2004).

### 1.1.1. Ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales que se encuentran en ambos hemisferios cerebrales y se encargan de regular diferentes funciones cognitivas y el control del movimiento. Estas estructuras están conformadas por los núcleos: caudado, putamen, globo pálido (interno y externo), la *sustancia nigra* (pars compacta y pars reticulata) y el núcleo subtalámico (Figura 2). Estas cinco estructuras forman el circuito motor extrapiramidal que conecta con la corteza motora primaria, la corteza premotora, así como con el tronco encefálico y se encargan de coordinar los movimientos voluntarios aprendidos (Purves et al., 2004).



**Figura 2.** Sección coronal del cerebro donde se muestran la localización de los ganglios basales. VA= ventral anterior; VL= ventral lateral. Modificado de (Purves et al., 2004).

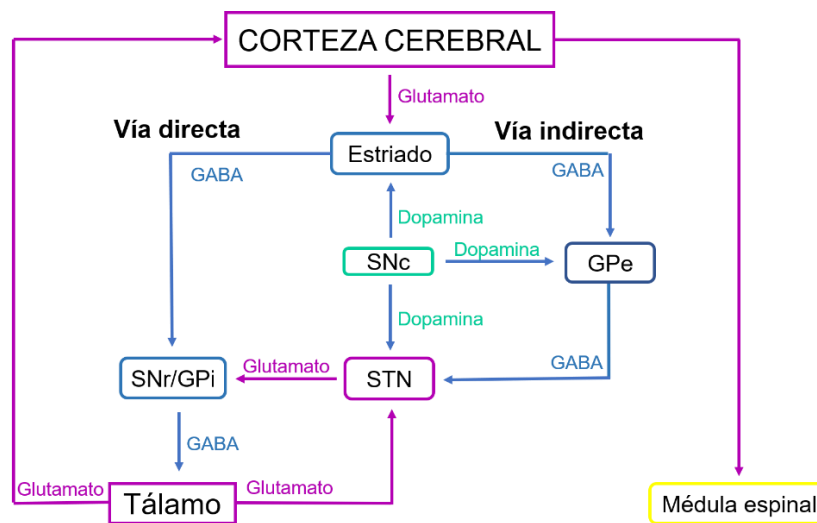
En humanos y en otros primates no humanos el núcleo caudado y el putamen se encuentran visiblemente separados por la cápsula interna, sin embargo, en roedores ambos núcleos se encuentran unidos y se les conoce como cuerpo estriado, en ambos casos estas estructuras se conforman por dos tipos neuronales: las neuronas espinosas medianas (NEMs) de proyección y las interneuronas. Las NEMs son de naturaleza GABAérgica y conforman aproximadamente el 95% del cuerpo estriado, reciben información de naturaleza glutamatérgica proveniente de la corteza y del tálamo. Las interneuronas componen el 5% restante del estriado y sus proyecciones no emergen fuera de éste, las interneuronas pueden ser de



naturaleza colinérgica o GABAérgica, estas últimas se dividen en diferentes subtipos dependiendo de su respuesta molecular, su morfología y su respuesta electrofisiológica (Lebouc, Richard, Garret, & Baufreton, 2020; Morán, 2013).

En roedores, el cuerpo estriado se divide en estriado dorsal y estriado ventral, de ambas divisiones emergen proyecciones de las NEMs que se conducen a través de dos vías, la vía directa y la vía indirecta. En la vía directa, el estriado envía proyecciones directas de naturaleza GABAérgica a los núcleos de salida de los ganglios basales (sustancia nigra pars reticulata y globo pálido interno) inhibiéndolos y con ello activando al tálamo y a la corteza cerebral provocando la señal de movimiento (Purves et al., 2004) (Figura 3).

En la vía indirecta, las NEMs envían información GABAérgica a el globo pálido externo, quien a su vez proyecta información de tipo GABAérgica al núcleo subtalámico y éste en respuesta manda información glutamatérgica a los núcleos de salida de los ganglios basales (sustancia nigra pars reticulata y el globo pálido interno), quienes inhiben la respuesta del tálamo y de la corteza cerebral promoviendo que no haya movimiento (Purves et al., 2004) (Figura 3).



**Figura 3.** Vía directa e indirecta del control del movimiento mediado por el estriado. De morado se presentan las vías que utilizan glutamato, de azul las vías que utilizan GABA y de verde las vías que utilizan dopamina. Modificado de (Gubellini, Pisani, Centonze, Bernardi, & Calabresi, 2004).



## **1.1.2. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN**

### **1.1.2.1. Neurotransmisores rápidos**

El glutamato y el ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA), son los principales neurotransmisores que median la comunicación de los ganglios basales, no obstante, el cuerpo estriado está controlado por otras moléculas neuromoduladoras como las monoaminas las cuales también intervienen en el control motor (Klein et al., 2019).

### **1.1.2.2. Monoaminas: Dopamina (DA)**

Las monoaminas son pequeñas moléculas que tienen un anillo aromático unido a una cadena alifática de dos carbonos, unida a su vez a un grupo amino y que son sintetizadas a partir de diferentes aminoácidos (Nichols & Nichols, 2008). En general, las monoaminas ejercen su acción sobre los circuitos neuronales al unirse a receptores metabotrópicos (con excepción de la serotonina que también puede unirse a un receptor ionotrópico) y tienen una modulación más lenta en comparación con la neurotransmisión rápida promovida por glutamato y GABA (Klein et al., 2019).

Las monoaminas se pueden clasificar en subgrupos, uno de ellos es el de las catecolaminas, las cuales están conformadas por la dopamina (DA), noradrenalina (NA) y la adrenalina. De ellas, la DA tiene un papel importante en la modulación de la actividad estriatal neuronal. Es sintetizada en el citosol, en donde la fenilalanina es transformada en tirosina (mediante la enzima fenilalanina hidroxilasa) y ésta es convertida en L-DOPA mediante la tirosina hidroxilasa, finalmente, la L-DOPA mediante la actividad de la DOPA descarboxilasa es transformada en DA (Figura 4). Una vez producida la dopamina en las neuronas presinápticas, esta es ingresada a vesículas que tienen un ambiente interno ácido, lo que la protege de ser oxidada, las vesículas liberan a la DA al espacio sináptico para que pueda unirse a alguno de sus receptores (D1, D2, D3, D4 y D5) en las neuronas postsinápticas y así ejercer su acción. Una vez que la DA entra en la célula postsináptica la monoamino-oxidasa



B metaboliza a la DA en 3,4- dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) que a su vez se convertirá en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el DOPAC mediante la enzima catecol-o-metiltransferasa es degradado a ácido homovanílico (HVA) (Figura 4) (Meiser, Weindl, & Hiller, 2013) (Klein et al., 2019).

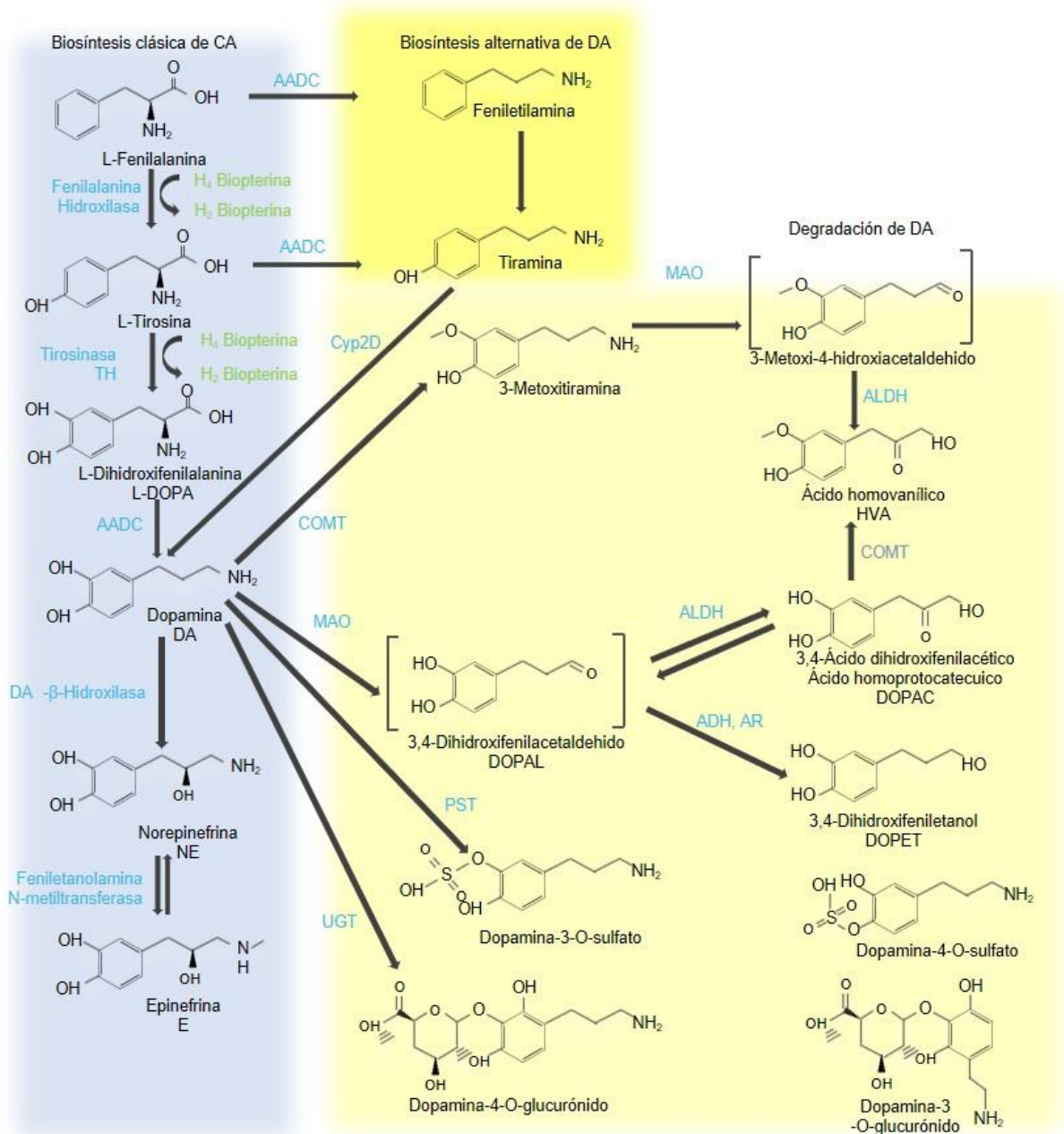


Figura 4. Síntesis y metabolismo de dopamina. Modificado de (Meiser et al., 2013).



La DA participa en el comportamiento y en las funciones motoras mediante la conectividad aferente de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta con el estriado. Otra fuente importante de dopamina que influye en el control del movimiento regulado por el estriado es el área tegmental ventral, la cual envía proyecciones dopaminérgicas hacia el estriado ventrolateral y a la parte dorso medial del núcleo accumbens. Sin embargo, las principales proyecciones dopaminérgicas al estriado dorsal emergen de la sustancia nigra pars compacta formando la vía nigroestriatal.

En las terminales de la sustancia nigra pars compacta (SNc) los autorreceptores D2 regulan los patrones de activación y liberación de la DA; una vez que la DA es liberada en el cuerpo estriado dorsal, esta modula la señalización glutamatérgica, GABAérgica, colinérgica y dopaminérgica en el cuerpo estriado a través de los receptores D1 y D2 de las NEMs. En las interneuronas GABAérgicas y en las interneuronas colinérgicas la DA regula la función de la memoria espacial, la motivación, las respuestas de recompensa y placer, la conducta sexual, así como el control de las neuronas motoras (Holly & Miczek, 2016; Klein et al., 2019; Koch & Raymond, 2019). La DA puede actuar sobre los receptores D1 y con esto aumentar la actividad de las NEMs de la vía directa mientras que la estimulación con dopamina de los receptores D2 disminuye la actividad de las NEMs de la vía indirecta.

Sin embargo, cuando los circuitos de los ganglios basales no funcionan adecuadamente se desarrollan diversas enfermedades como lo son las enfermedades neurodegenerativas. Una de las principales enfermedades que se genera con la degeneración del estriado es la enfermedad de Huntington (EH), durante la cual las primeras neuronas que se degeneran son las NEMs de la vía indirecta lo cual conduce a la inhibición deficiente de los movimientos clasificados como coreicos. Además de la disminución del estriado durante la EH también hay una pérdida del volumen cortical ya que también se presenta la pérdida de neuronas piramidales corticales principalmente en áreas motoras y premotoras (Bunner & Rebec, 2016; Koch & Raymond, 2019).



## **1.2 NEURODEGENERACIÓN: MODELOS DE ESTUDIO (ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO)**

El mantenimiento de la estructura y función del cuerpo estriado resulta fundamental para llevar a cabo correctamente los programas motores aprendidos; su alteración puede desencadenar el establecimiento de diversas enfermedades neurodegenerativas.

Cambios moleculares durante el desarrollo de diferentes enfermedades neurodegenerativas provocan muerte neuronal de zonas específicas del cerebro, agravando la neurodegeneración. La acumulación de diferentes proteínas es uno de los cambios moleculares que comúnmente se presentan durante el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Dichas enfermedades neurodegenerativas se pueden diferenciar entre sí por la proteína que se acumula en una región específica del cerebro, además de que las manifestaciones clínicas de estas enfermedades reflejan la región concreta del cerebro y la población específica de células que se encuentran afectadas (H. Fu, Hardy, & Duff, 2018). Dentro de los padecimientos que se pueden desarrollar por alteraciones estructurales y funcionales del cuerpo estriado se encuentran la corea acantocitosis, la parálisis supranuclear progresiva y la EH, las cuales tienen como características comunes ser desórdenes neurodegenerativos que desarrollan trastornos de movimiento, así como manifestaciones psiquiátricas y cognitivas (Looi & Walterfang, 2013).

### **1.2.1. Disfunción mitocondrial y estrés oxidante**

Otro de los cambios moleculares que se presentan durante el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas está ligado a mecanismos que producen un déficit energético, incluyendo daño en la fosforilación oxidativa, estrés oxidativo, daño en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, anomalías en el tráfico mitocondrial, descenso de la glucólisis y un déficit en el complejo II (succinato deshidrogenasa SDH) y complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria mitocondrial (Napolitano et al., 2004; Rosenstock, Duarte, & Rego, 2010). Los daños causados por el estrés oxidativo incluyen peroxidación lipídica, oxidación proteica, mutación y



oxidación del DNA y todos han sido asociados con el agravamiento de la neurodegeneración. Se ha reportado en el núcleo caudado de pacientes con neurodegeneración, la presencia de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG), el cual es un marcador de oxidación de DNA (Browne et al., 1997). Así mismo, existe un aumento significativo de 8-OHdG en el DNA mitocondrial de la corteza parietal de los pacientes con estados avanzados de enfermedades neurodegenerativas (Polidori, Mecocci, Browne, Senin, & Beal, 1999), al igual que un aumento del marcador de peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA) (Aguilera et al., 2007; Tabrizi et al., 2000).

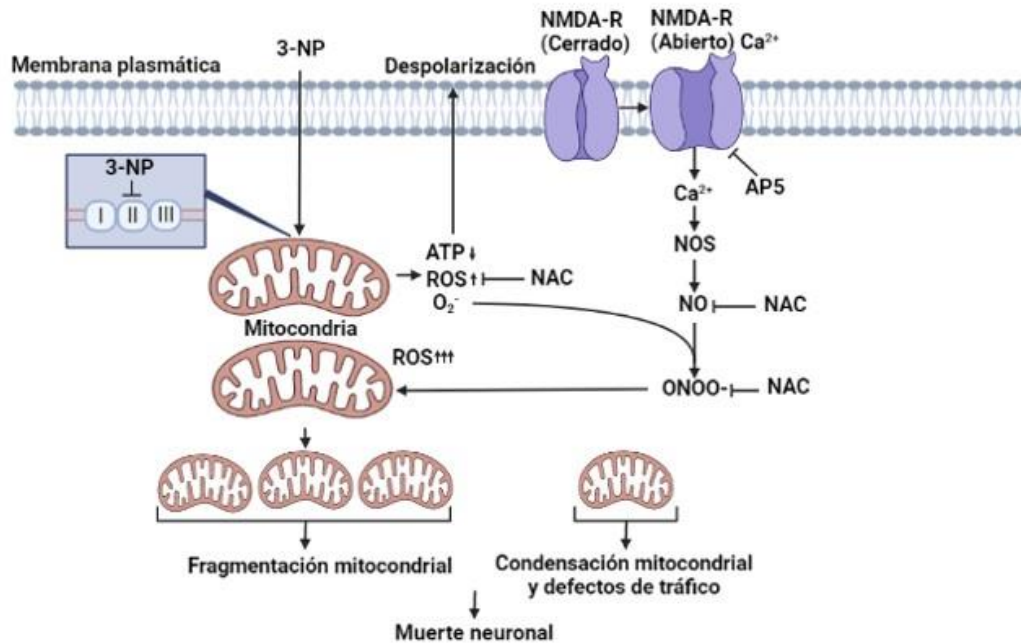
El estrés oxidativo es un proceso que se encuentra presente durante el desarrollo de la EH y otras enfermedades neurodegenerativas, por lo que se han buscado modelos experimentales que imiten la degeneración neuronal que se presenta durante la enfermedad. Una de las estrategias utilizadas es la inyección sistémica de toxinas mitocondriales en el cuerpo estriado de roedores las cuales han mostrado producir degeneración neuronal (Alarcon-Herrera et al., 2017; Wang & Qin, 2006).

El ácido 3 nitropropiónico (3-NP) es una neurotoxina que se identificó en el oeste de Estados Unidos de Norte América como un agente tóxico responsable de la intoxicación del ganado. El consumo de las leguminosas *Indigofera* o *Astragalus* por el ganado les provocaba fallas motoras como debilidad general y mala coordinación de la patas traseras hasta llegar a la parálisis y, en humanos se ha reportado que la ingesta accidental de caña de azúcar contaminada con el hongo *Arthrimum* que produce 3-NP causa encefalopatía aguda, un estado comatoso durante varios días en gran parte de los pacientes y un deterioro neurológico persistente caracterizado por distonía de inicio retardado, espasmo de torción, muecas faciales y movimientos espasmódicos en muchos de ellos (Brouillet, Conde, Beal, & Hantraye, 1999).

Estudios bioquímicos han establecido que el 3-NP es un inhibidor selectivo del complejo II succinato deshidrogenasa (SDH), la cual es una enzima localizada en la membrana mitocondrial interna cuya función es oxidar el succinato a fumarato







**Figura 6.** Alteraciones moleculares promovidas por el bloqueo del complejo II mitocondrial con 3-NP (Liot et al., 2009).

Debido a que los daños provocados por la administración de concentraciones bajas y subcrónicas de 3-NP (Rodríguez et al., 2010), imitan la histopatología de la EH encontrada en los cerebros post mortem y en los modelos transgénicos, el 3-NP es ampliamente utilizado para investigar los mecanismos patológicos que se presentan durante la neurodegeneración estriatal (Brouillet et al., 1999).

Se ha sugerido que neurotransmisores como el glutamato, la DA y sus receptores son factores clave en el proceso de neurodegeneración de las NEMs en presencia de 3-NP (Brouillet et al., 1999; Hernández-Echeagaray, Rosa-López, & Mendoza-Duarte, 2012). Se ha reportado en modelos *in vivo* que asemejan estadios tempranos de la EH que la inhibición mitocondrial producida por el 3-NP provoca una modificación de las corrientes promovidas por la administración de GABA en las NEMs (Flores-Hernandez et al., 2018), la plasticidad sináptica mediante la modulación de moléculas que participan en vías de señalización del estriado (Gomez-Pineda, Torres-Cruz, Vivar-Cortes, & Hernandez-Echeagaray, 2018) y



cambios en la función cortico-estriatal así como la expresión de neurotrofinas (Mendoza et al., 2014).

### **1.2.2. Efectos sistémicos del 3-NP**

A pesar de que la administración sistémica de 3-NP afecta preferentemente a las neuronas estriatales (Bunner & Rebec, 2016), también puede afectar otras estructuras corporales debido a que (como ya lo hemos mencionado anteriormente) sus efectos se deben al bloqueo del complejo II mitocondrial (Liot et al., 2009). Uno de los órganos que se ven afectados por la disfunción mitocondrial que promueve la administración sistémica de 3-NP es el hígado (Y. T. Fu, He, Zhang, & Zhang, 1995; Mirandola, Melo, Saito, & Castilho, 2010).

El hígado es uno de los órganos que se encargan de metabolizar e inactivar sustancias exógenas como el alcohol, drogas, contaminantes ambientales y toxinas. Esta desintoxicación sistémica que realiza el hígado lo hace a través de sistemas enzimáticos que convierten las sustancias tóxicas en derivados solubles en agua que luego pueden ser excretados eficientemente por el riñón (Grant, 1991).

Sin embargo, niveles anormales de enzimas hepáticas pueden indicar daño agudo o crónico hepático y esto da como resultado un aumento de las concentraciones séricas de aminotransferasas. Las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) también conocida como transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) y alanina aminotransferasa (ALT) o también conocida como transaminasa glutámico pirúvica (TGP), son enzimas que catalizan la transferencia de grupos  $\alpha$ -amino del aspartato y la alanina al grupo  $\alpha$ -ceto del ácido cetoglutárico para generar ácidos oxalacético y pirúvico, respectivamente, que contribuyen de forma importante al ciclo del ácido cítrico (Giannini, Testa, & Savarino, 2005).

Ambas aminotransferasas están altamente concentradas en el hígado. Sin embargo, también podemos encontrar la AST de forma difusa en corazón, músculo esquelético, riñón, cerebro y glóbulos rojos por lo que un aumento sérico de ALT es más específico para daño hepático y esto también está relacionado con que ALT en hígado solo la encontramos en el citoplasma celular mientras que solo el 20% de la



AST es citosólica y el 80% restante es mitocondrial (Giannini et al., 2005). Sin embargo, a pesar de que el 3-NP promueve disfunción mitocondrial hepática aún no se ha demostrado si este compuesto produce cambios en los niveles de las transaminasas.

### 1.2.3. Inflamación

La inflamación es otro mecanismo que puede ser desencadenado por la disfunción mitocondrial. El proceso inflamatorio se define como la respuesta biológica del organismo ante daños que se presentan en los tejidos, con la finalidad de prevenir lesiones posteriores (Witte, Geurts, de Vries, van der Valk, & van Horsen, 2010). La disfunción mitocondrial es capaz de provocar daño en los tejidos cuando se presenta una disminución en la producción de ATP por la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que promueve una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, favoreciendo mayor estrés oxidativo. Un aumento en radicales como el anión superóxido  $O_2^-$  provenientes de la mitocondria promueve la activación de factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa\beta$ , el cual es un factor clave en la regulación de la inflamación de los tejidos; la activación de este factor de transcripción es importante en el establecimiento de la inflamación aguda y crónica (Lopez-Armada, Riveiro-Naveira, Vaamonde-Garcia, & Valcarcel-Ares, 2013).

Se ha establecido que durante la neurodegeneración se presenta un estado inflamatorio, el cual involucra la síntesis de mediadores como citocinas y quimiocinas por parte de las poblaciones de las células gliales presentes (van Horsen, van Schaik, & Witte, 2019), en el caso de la EH, la proteína huntingtina poliglutaminada promueve la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) (Tai et al., 2007) en la microglía y los astrocitos. Estudios de tomografía de emisión de positrones han mostrado acumulación de microglía reactiva y de astrocitos en el cerebro de pacientes con EH (Tai et al., 2007). Además, estos pacientes presentan un aumento en los niveles de interleucinas (IL) como IL-



4, IL-8 IL-10 y TNF- $\alpha$  en plasma sanguíneo con la progresión de la enfermedad, así como también persistencia de niveles elevados de macrófagos inflamatorios y monocitos (Bjorkqvist et al., 2008).

Los procesos inflamatorios durante la neurodegeneración promueven la muerte neuronal, la cual activa mecanismos inflamatorios en las neuronas vecinas, lo que conduce a un ciclo de inflamación y neurodegeneración sostenida que contribuye al daño que se presenta durante la EH (Valadao et al., 2020).

### 1.3 ANTIOXIDANTES

El estrés oxidante juega un papel importante en el establecimiento y progresión de daño neuronal, los modelos de neurodegeneración (como el uso de 3-NP), permiten asemejar la degeneración estriatal mediante la inducción de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación producen radicales libres, que inician reacciones en cadena que dañan a las células, los antioxidantes terminan estas reacciones en cadena al eliminar los radicales libres que se han producido e inhiben otras reacciones oxidativas al oxidarse ellos mismos (Arun & Rinshana, 2019; Azeez, 2019).

Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grandes grupos: endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos incluyen todos los mecanismos naturales que las células producen para protegerse del exceso de radicales libres, como son las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, entre otras (Ighodaro & Akinloye, 2018). Los antioxidantes exógenos se refieren a moléculas con actividad antioxidante que se obtienen de los alimentos o suplementos alimenticios, estos antioxidantes abundan en frutas y verduras, así como en otros alimentos como nueces, cereales, así como en algunas carnes de ave y pescado. Los antioxidantes exógenos a su vez pueden agruparse en dos grandes categorías: 1) antioxidantes primarios o naturales y 2) antioxidantes secundarios o sintéticos (Arun & Rinshana, 2019).



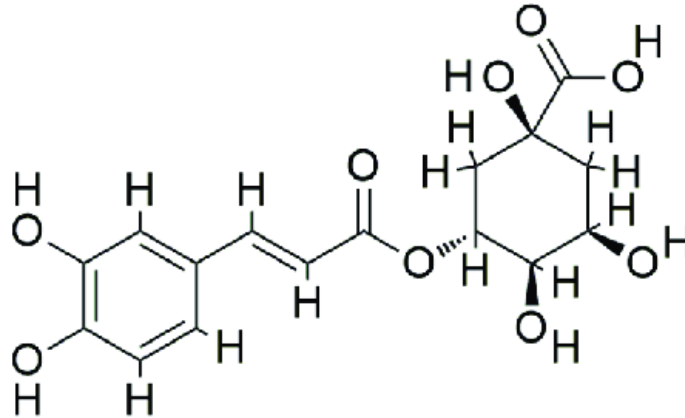
Los antioxidantes primarios o naturales se componen principalmente por estructuras fenólicas y se clasifican en 3 grupos:

- 1) antioxidantes minerales, los cuales son cofactores de enzimas antioxidantes como el selenio, el cobre, el hierro, etc.
- 2) vitaminas antioxidantes, que son necesarias para la mayoría de las funciones metabólicas del cuerpo, como la vitamina C, la vitamina E y vitamina B.
- 3) fitoquímicos, son compuestos fenólicos que no son ni vitaminas ni minerales y estos incluyen a los flavonoides, los cuales son compuestos fenólicos presentes en frutas, verduras, granos, semillas y flores.

En los últimos años los ácidos fenólicos han recibido gran atención en el área de la salud debido a los prometedores efectos antiinflamatorios y antioxidantes que han mostrado. Un antioxidante de naturaleza fitoquímica de estructura fenólica que puede disminuir los radicales libres generados por el 3-NP es el ácido clorogénico (CGA).

### **1.3.1 Ácido clorogénico (CGA)**

El CGA (Figura 7) se encuentra en diversos alimentos como frutas y verduras y se ha reportado estar presente en altos niveles en el té verde y el café. Un tercio de este ácido fenólico se absorbe fisiológicamente en el intestino delgado y los dos tercios restantes se absorbe vía intestino grueso, donde el CGA se metaboliza más eficientemente por la microbiota nativa. Las propiedades antioxidantes del CGA están relacionadas con la eliminación directa de radicales hidroxilo (OH), radicales peróxido (OOH), así como iones superóxido ( $O_2^-$ ) de una manera dependiente de la dosis (Anggreani & Lee, 2017; Brendan & Tien, 2018; Naveed et al., 2018; Zang, Cosma, Gardner, Castranova, & Vallyathan, 2003).



**Figura 7.** Estructura molecular del Ácido Clorogénico (CGA) (National Center for Biotechnology Information, 2023).

En un modelo de neuronas corticales primarias el cotratamiento con CGA disminuye la condensación nuclear (el cual es indicativo morfológico de apoptosis) provocada por  $H_2O_2$ , este tratamiento también dio como resultado un aumento de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en las neuronas corticales (J. Kim et al., 2012).

Otro de los efectos descritos de la administración del CGA en la corteza cerebral frontal e hipocampo es la mejora de la capacidad cognitiva ya que el CGA inhibe las especies reactivas de oxígeno, así como la actividad de la acetilcolinesterasa, promoviendo una mayor disponibilidad de acetilcolina, lo que mejora el aprendizaje y la memoria de ratones con amnesia inducida mediante la administración de escopolamina (Kwon et al., 2010).

La administración de CGA ha mostrado aumentar la disponibilidad de DA en cultivos de células PC-12, lo cual se ha relacionado con la disminución de especies reactivas de oxígeno (Walker et al., 2012).

Nuestro grupo de investigación demostró que el CGA disminuye el efecto tóxico y genotóxico provocado por la administración de 3-NP en ratones (Alarcon-Herrera et al., 2017). Sin embargo, aún no se ha demostrado si el CGA produce cambios en los niveles de DA en modelos de neurodegeneración, en particular en



el modelo subcrónico de 3-NP que asemeja etapas tempranas de la EH. Lo anterior es de suma importancia debido a las funciones que tiene la DA en el cuerpo estriado.

Todas estas evidencias abren la posibilidad de que el CGA sea utilizado como agente terapéutico que disminuya el estrés oxidativo inducido en la degeneración estriatal provocada por la administración de 3-NP.





## 2.0. Justificación

La producción de radicales libres que causan estrés oxidativo y la presencia de procesos inflamatorios en las neuronas estriatales juega un papel importante en la muerte neuronal que se presenta durante la neurodegeneración. Esta muerte neuronal puede alterar los niveles de los neurotransmisores y neuromoduladores que regulan los diferentes circuitos neuronales, afectando numerosas funciones de los organismos.

Una estrategia para evitar el desarrollo de procesos neurodegenerativos es evitar o reducir los procesos de estrés oxidante en las neuronas. El uso de antioxidantes es una estrategia propuesta para evitar los procesos oxidativos e inflamatorios y con ello permitir que las células preserven sus procesos metabólicos y fisiológicos adecuados

En particular es importante investigar si el antioxidante CGA puede evitar o contrarrestar los efectos oxidativos del 3-NP y con ello impedir la modificación del estado inflamatorio y de la síntesis de neurotransmisores y neuromoduladores que favorecen el establecimiento y o desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

## 3.0. Hipótesis

- Debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, el CGA tendrá un efecto neuroprotector en un modelo murino de degeneración estriatal temprana producido por la administración de 3-NP.



#### **4.0. Objetivos**

##### **4.1. Objetivo General**

- Determinar el efecto neuroprotector del CGA en un modelo de degeneración estriatal temprana inducido por la aplicación de 3-NP.

##### **4.2. Objetivos particulares**

- Evaluar el estrés oxidativo en un modelo murino de neurodegeneración estriatal temprana promovido por la administración de ácido 3-NP y el efecto del CGA en este modelo.
- Cuantificar marcadores inflamatorios y antiinflamatorios en un modelo murino de degeneración estriatal temprana promovido por la administración de ácido 3-NP y el efecto que tiene el CGA en dicho modelo.
- Evaluar el efecto del CGA en las transaminasas hepáticas en un modelo murino de degeneración estriatal temprana promovido por la administración de ácido 3-NP.
- Determinar niveles de dopamina en un modelo murino de neurodegeneración estriatal temprana promovido por la administración de ácido 3-NP y/o el tratamiento con CGA.



## 5.0. Diseño experimental

Para evaluar el efecto neuroprotector de la administración del CGA se utilizó un modelo de degeneración estriatal temprana inducido por la administración de ácido 3-NP, para ello se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 de 35 días de edad, los cuales recibieron el 3-NP a una concentración de 15 mg/kg por día y/o CGA en una concentración de 100 mg/kg por día vía intraperitoneal, de acuerdo a las siguientes condiciones: 1) control negativo, PBS, 2) control positivo, 3-NP durante 5 días, 3) únicamente CGA durante 5 días, 4) coadministración, 3-NP junto con CGA durante 5 días.

Debido a que un síntoma de la EH es la pérdida involuntaria del peso corporal, registramos el peso corporal de los ratones durante los días de tratamiento para determinar si el 3-NP o el CGA tenían algún efecto sobre el peso corporal.

Al octavo día del comienzo de los tratamientos los sujetos fueron sacrificados por decapitación siguiendo la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Todos los procedimientos del presente proyecto fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala con el número de folio 1242. Se obtuvo el cerebro y de este se separó el cuerpo estriado y la corteza frontal de cada sujeto de experimentación para evaluar estrés oxidativo, inflamación, y los niveles de dopamina, y serotonina.

En la disección de los animales se observó un cambio en el tamaño del hígado de los ratones tratados con 3-NP por lo que se procedió a extraer el hígado para determinar el peso de este órgano. Además, durante el sacrificio también se obtuvo el suero de los ratones para la medición de la función hepática y los niveles sistémicos de citocinas.

Para evaluar la función hepática se midieron las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) o transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) y alanina aminotransferasa (ALT) o transaminasa glutámico pirúvica (TGP) con el kit (Quantitative determination of alanine aminotransferase GPT (ALT) IVD,



SPINREACT y Quantitative determination of aspartate aminotransferase GOT (AST), IVD, SPINREACT.)

Para conocer el estrés oxidativo se cuantificó la peroxidación de lípidos mediante la técnica de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando un kit comercial (MDA Assay, TBARS Assay, Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay, Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al control a 100 unidades arbitrarias.

En cuanto al estudio de la respuesta inflamatoria se realizaron ELISAS dirigidas a citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4 e IL-2, respectivamente) en muestras de suero sanguíneo, cuerpo estriado y corteza cerebral frontal, utilizando kits de ELISA Preprotech (Murine Standar ABTS ELISA Development Kit) y leídos con un lector de ELISA marca BioTek (Elx800).

Finalmente, las muestras de estriado y corteza cerebral frontal se sonicaron en 0.1 N de ácido perclórico y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar las monoaminas. Mientras que el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionó 0.5 M de NaOH y fue sonicado. Esta preparación se utilizó para determinar los niveles de proteína en tejido por la técnica de Bradford.

Se determinaron los niveles de dopamina y serotonina (así como sus principales metabolitos) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) para ello las muestras procesadas se inyectaron mediante un muestreador automático (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) en una bomba PerkinElmer, serie 200, acoplada a una columna de fase inversa C18 (columna ESA HR 80, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y procesadas en un detector electroquímico LC-4C (Bioanalytical system, West Lafayette, IN, EE. UU.) ajustado a 0.850 V en relación con un electrodo de plata/cloruro de plata, y la sensibilidad se fijó en 10 nA en cuerpo estriado y corteza frontal. Los datos se presentan en ng/mg de proteína.



## Análisis estadístico

Debido a que, dentro de la naturaleza de la mayoría de nuestros datos, no se cumplía los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, la prueba estadística aplicada en la mayoría de los resultados fue el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se obtuvieron con la prueba post hoc de Dunn. A los resultados obtenidos de peso corporal se aplicó la prueba estadística de análisis de varianza de dos factores con medidas repetidas en un factor, con la posterior aplicación de la prueba de Tukey.

Los análisis estadísticos se obtuvieron con el software SIGMA PLOT 12 y GraphPad Prism 9. Los datos de peso corporal se representan en una gráfica de dispersión mientras que los datos restantes se presentan en gráficas de box plot mostrando la mediana y los percentiles a 25% y 75% de los diferentes grupos, tales gráficas se obtuvieron con el programa GraphPad Prism 9.



## 6.0. Resultados

En el presente trabajo utilizamos un modelo de degeneración estriatal temprana con concentraciones subcrónicas de 3-NP y utilizamos el antioxidante CGA para observar su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, así como su capacidad de regular transaminasas hepáticas y los neuromoduladores dopamina y serotonina, los resultados se describen a continuación.

### 6.1. Peso corporal

En el día 1 se comenzó con la toma del peso corporal para dividir a los ratones aleatoriamente para cada tratamiento (vehículo, 3-NP, CGA y 3NP+CGA); una vez separados por grupos se procedió inmediatamente a administrar los respectivos tratamientos. Durante el tiempo de administración de los tratamientos se registró el peso corporal de los animales ( $n=23$  por grupo, media  $\pm$  error estándar) cada 24 hrs durante 5 días. Se realizó un ANOVA de dos factores de medidas repetidas para analizar el efecto de los tratamientos (factor A) en el transcurso del tiempo (factor B como medida repetida) sobre el peso corporal de los sujetos. Seguido del ANOVA de dos vías se realizó el análisis post hoc de Tukey para conocer entre que grupos había diferencias significativas (Figura 8).

El ANOVA de dos factores de medidas repetidas para el peso de los ratones tratados con vehículo, 3-NP, CGA o 3-NP+CGA, arrojó un efecto estadísticamente significativo de los tratamientos ( $F(3,88) = 4.69$ ,  $p < 0.01$ ), un efecto significativo del peso de los animales a través del tiempo ( $F(4,352) = 59.51$ ,  $p < 0.0001$ ) y una interacción significativa entre los tratamientos y el tiempo ( $F(12,352) = 2.35$ ,  $p < 0.01$ ).

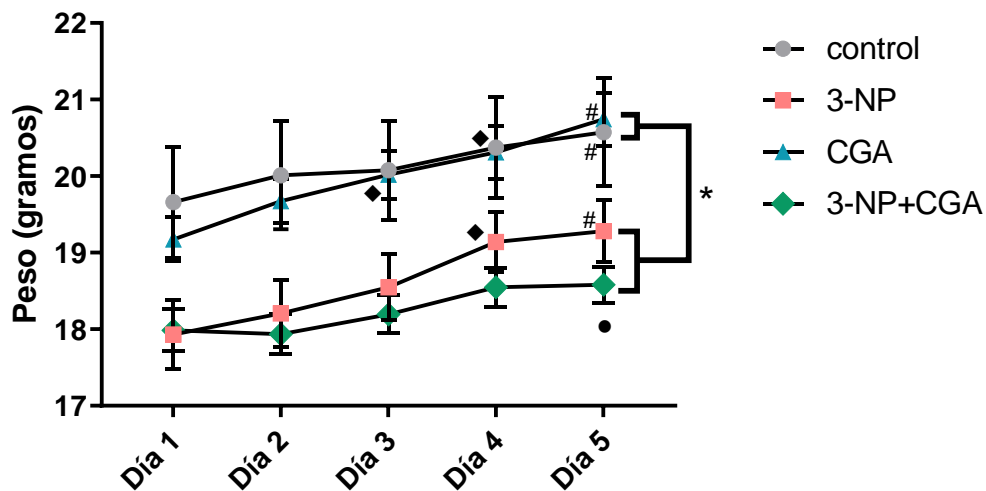
Posteriormente la prueba de Tukey mostró que los grupos tratados con 3-NP y cotratado con 3-NP+CGA tuvieron un peso estadísticamente menor a los grupos control y CGA ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ , respectivamente) desde el día 1 hasta el día



5. Además, en el día 5 el grupo tratado con 3-NP mostró un peso corporal estadísticamente mayor que el grupo cotratado ( $p < 0.05$ ) (Figura 8).

Así mismo con la prueba de Tukey obtuvimos que al comparar el peso inicial con respecto al resto de los días produjo los siguientes cambios: El tratamiento 3-NP produjo un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal de los roedores a partir del día 4 ( $p < 0.0001$ ) y se mantuvieron los cambios en el día 5 ( $p < 0.0001$ ). El grupo tratado con CGA produjo un aumento en el peso corporal estadísticamente significativo a partir del día 3 ( $p < 0.001$ ) y se mantuvo a lo largo de los días 4 ( $p < 0.0001$ ) y 5 ( $p < 0.0001$ ). El grupo cotratado con 3-NP+CGA no mostró cambios en el peso corporal de los ratones a lo largo del tiempo. El grupo que no recibió ningún tratamiento también mostró un aumento en el peso corporal al comparar el día uno con el día 4 ( $p < 0.01$ ) y se mantuvo en el día 5 ( $p < 0.0001$ ) (Figura 8).

### Peso de animales durante el tratamiento

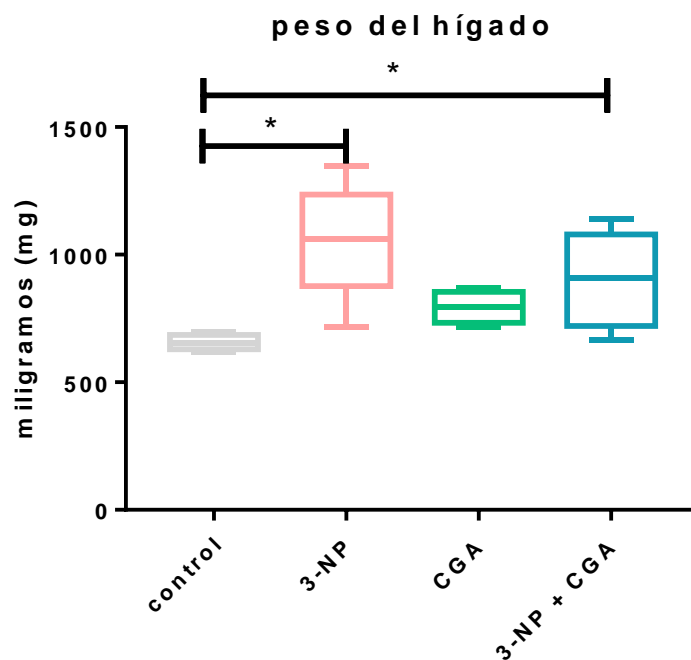


**Figura 8.** Peso corporal de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido Clorogénico) o coadministrado con 3-NP y CGA durante 5 días. Se muestran las medias,  $\pm$  errores estándar. \*  $p < 0.0001$  vs control y CGA. ♦  $p < 0.05$  vs 3-NP. #  $p < 0.0001$  día 5 vs día 1.



## 6.2. Peso del hígado

Debido a que el hígado es el órgano encargado de la desintoxicación del cuerpo, se cuantificó el peso del hígado. La prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal Wallis arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al peso del hígado ( $H(3) = 19.805, p=0.001$ ), encontrando un aumento significativo del grupo tratado con 3-NP y del cotratado con 3-NP + CGA comparándolos con el grupo control (prueba de Dunn,  $p=0.05$ ), efecto que no se observó con la administración de CGA, ya que el peso del hígado no se modificó comparándolo con el grupo control (Figura 9), lo que nos indica que uno de los efectos del uso del 3-NP es el aumento del peso del hígado.



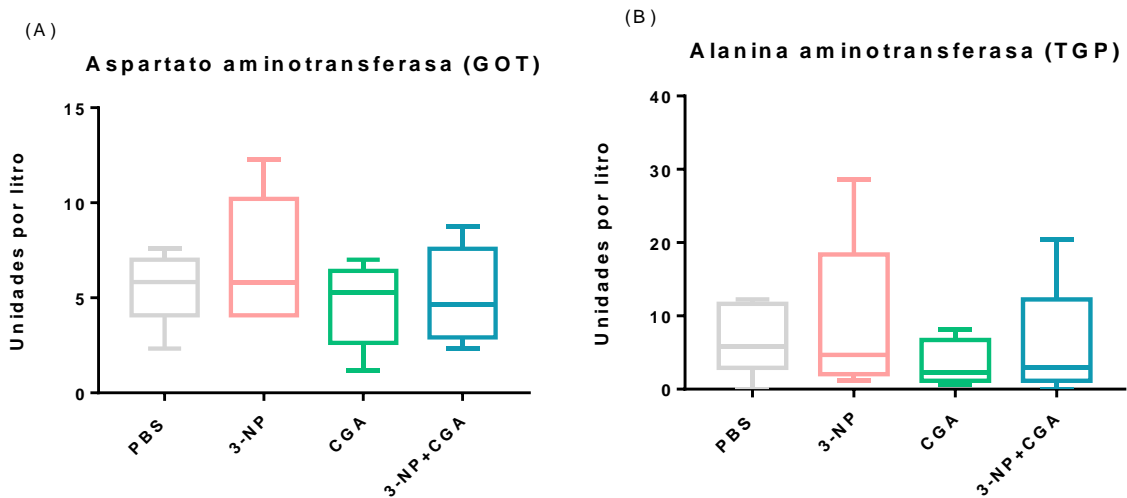
**Figura 9.** Medianas (con rangos intercuartílicos) del peso del hígado de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA. \*  $<0.05$ ,  $n=8$  por grupo.





### 6.3. Transaminasas

Ya que encontramos diferencias en el peso de los hígados de los sujetos decidimos evaluar la función hepática de los animales mediante la cuantificación de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), también llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) y alanina aminotransferasa (ALT) o también nombrada como transaminasa glutámico pirúvica (TGP). Los resultados del análisis estadístico Kruskal-Wallis no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de GOT ( $H(3) = 0.972, p = 0.808$ ) ni de ALT ( $H(3) = 1.929, p = 0.587$ ) (Figura 10).



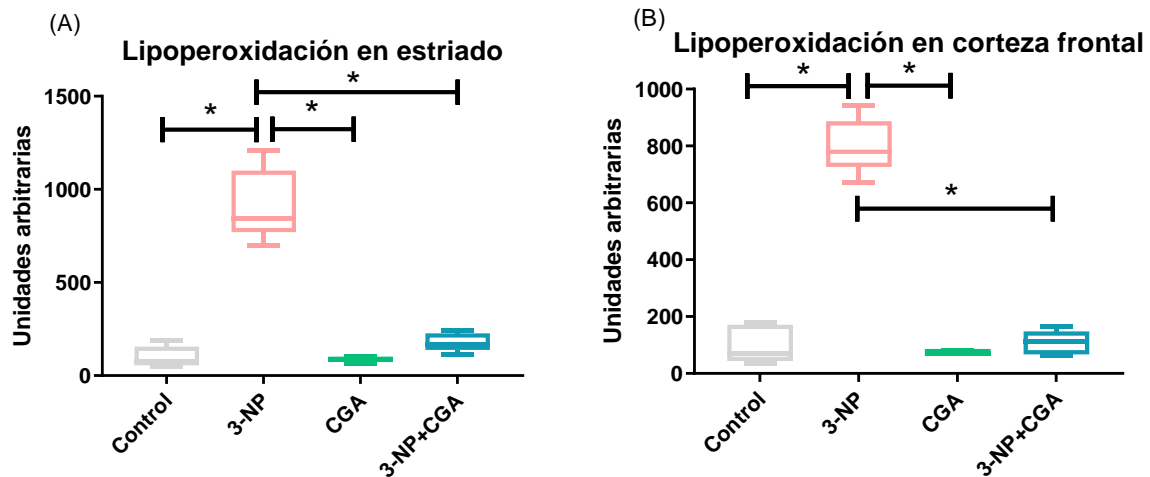
**Figura 10.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de aspartato aminotransferasa (A) y de alanina aminotransferasa (B) en suero de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA. \* < 0.05, n=5 por grupo.



## 6.4. Lipoperoxidación

Por otro lado, parte de los síntomas clínicos que se generan durante las enfermedades neurodegenerativas son ocasionadas por cambios en el metabolismo celular que se llevan a cabo en el Sistema Nervioso. Dichos cambios se originan por alteraciones moleculares, como el estrés oxidante.

Para determinar los niveles de estrés oxidante que se generan durante la administración de 3-NP, se midieron productos finales de la peroxidación lipídica mediante el ensayo de TBARS en cuerpo estriado y corteza cerebral frontal. El estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis mostró que hay diferencias estadísticamente significativas tanto en el estriado ( $H(3) = 17.509, p = 0.001$ ) como en la corteza frontal ( $H(3) = 10.692, p = 0.014$ ) encontrando que el 3-NP aumenta la lipoperoxidación comparándolo con el grupo control (prueba de Dunn,  $p = 0.05$ ), además de que el grupo tratado con CGA presentó menores niveles de lipoperoxidación que el grupo tratado con 3-NP (prueba de Dunn,  $p = 0.05$ ), asimismo se observó que el grupo coadministrado previno por completo los niveles de lipoperoxidación en estriado y corteza inducida por 3-NP (Figura 11).



**Figura 11.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de los niveles de peroxidación lipídica en A) estriado y B) corteza frontal de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA. \* < 0.05, n=5 por grupo.



## 6.5. Citocinas

Una de las consecuencias de la inducción de estrés oxidante en los tejidos es la producción de un estado proinflamatorio local y dependiendo de la severidad y cronicidad del estado oxidante, se puede producir un estado proinflamatorio sistémico. Para caracterizar la inducción del estado inflamatorio sistémico por la administración de 3-NP junto con el efecto que podía tener la coadministración de 3-NP y CGA en el estado inflamatorio, se analizaron citocinas pro y antiinflamatorias en el suero de los ratones mediante el ensayo de ELISA sándwich. Se obtuvieron las concentraciones de las citocinas TNF, IL-6, IL-4 e IL2 en el estriado y la corteza frontal de los grupos experimentales realizando interpolaciones a partir de curvas estándar a las que se les aplicó una prueba de correlación de regresión lineal. Sin embargo, no se detectaron concentraciones suficientes de las citocinas mencionadas en suero (Apéndice 1), lo que nos indica que el estado inflamatorio sistémico provocado por la administración subcrónica de 3-NP, que imita etapas tempranas de la neurodegeneración estriatal, no produce la liberación sistémica de concentraciones detectables de las citocinas analizadas.

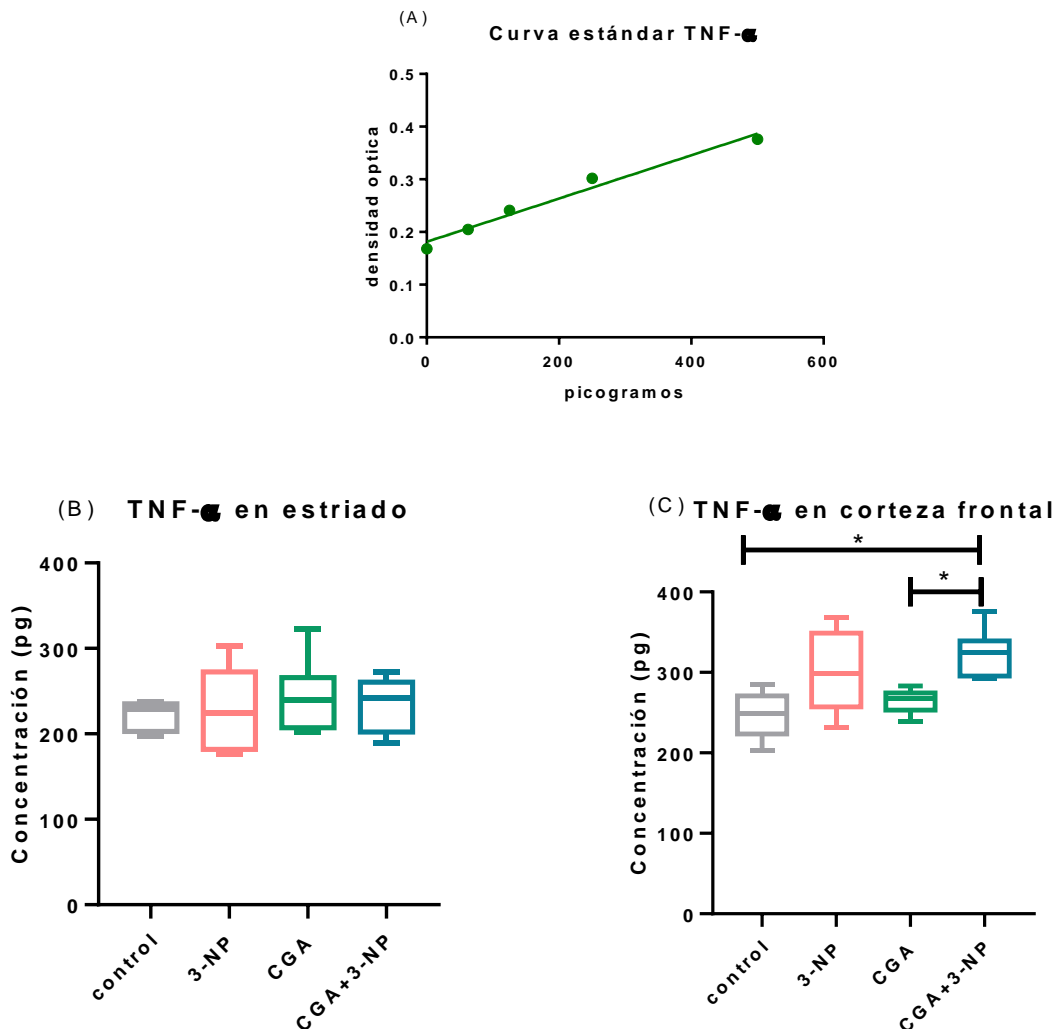
Debido a que no se obtuvieron niveles detectables de las citocinas investigadas en suero (Apéndice 1), nos dimos a la tarea de analizar la presencia de las mismas citocinas directamente en la corteza frontal y el cuerpo estriado usando la técnica de ELISA, para conocer si se desarrollan procesos inflamatorios locales con nuestro modelo. Además, se realizó un experimento independiente para corroborar la ausencia de las citocinas de interés en suero observada anteriormente.

### 6.5.1. TNF- $\alpha$

En la figura 12 se muestra en (A) las densidades ópticas de diferentes concentraciones de la citocina TNF- $\alpha$  recombinante las cuales fueron utilizadas para obtener una curva estándar; las concentraciones de dicha citocina en muestras de estriado y corteza frontal fueron determinadas mediante análisis de regresión lineal con un coeficiente de determinación de 0.98 ( $R^2=0.98$ ), indicando un buen ajuste de la curva estándar a los datos. En (B) se observan las concentraciones de la citocina



en el estriado y en (C) los niveles de TNF en la corteza frontal. Para conocer si había diferencias estadísticamente significativas de TNF- $\alpha$  aplicamos la prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual arrojó diferencias estadísticamente significativas en la corteza frontal ( $H(3) = 15.001, p=0.002$ ) donde hubo un aumento significativo en el grupo cotratado con 3-NP+CGA comparándolo con el grupo control ( $p<0.05$ ) y con el grupo tratado solamente con CGA (prueba de Dunn,  $p<0.05$ ).



**Figura 12.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de las concentraciones de TNF- $\alpha$ . (A) concentraciones de la curva estándar. (B) Concentraciones en estriado y (C) concentraciones en corteza frontal de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA. \*  $< 0.05$ ,  $n=8$  por grupo.

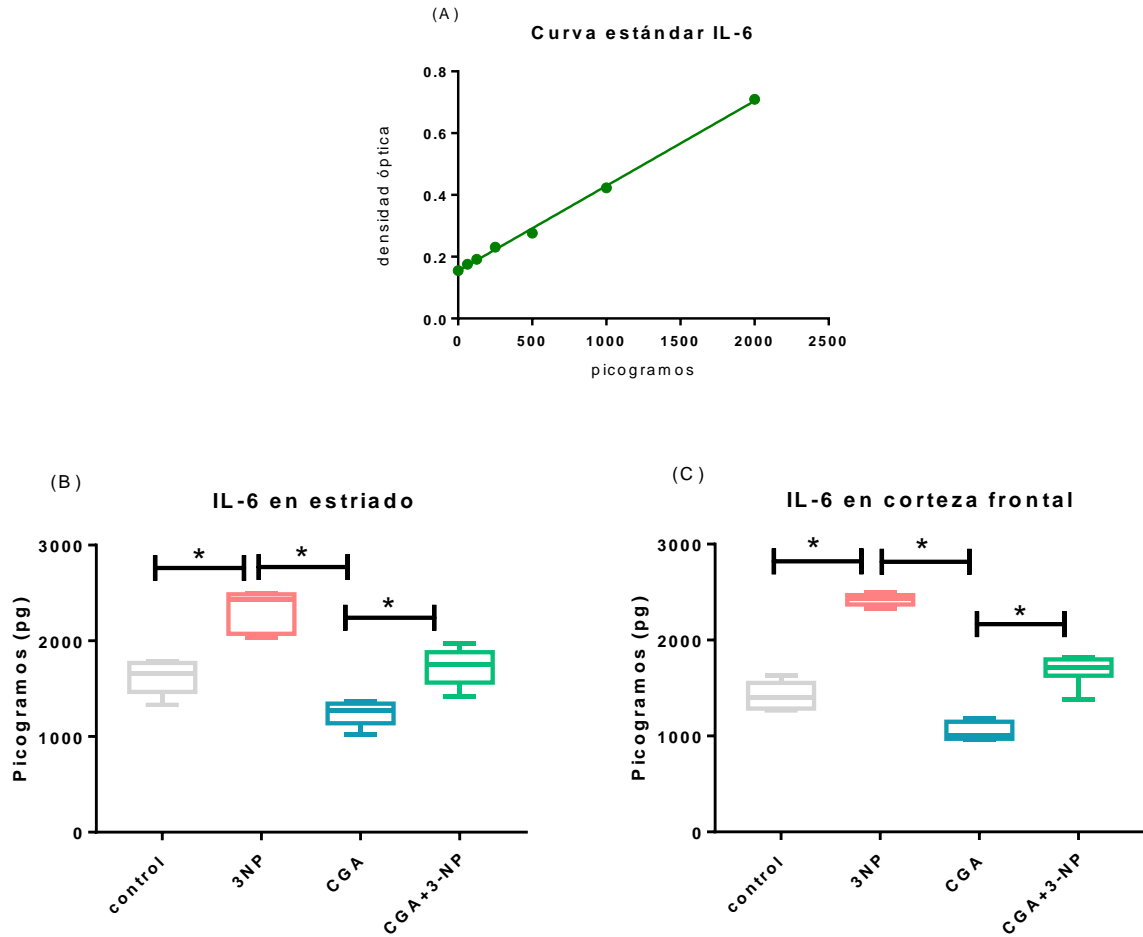


### 6.5.2. IL-6

Del mismo modo obtuvimos las concentraciones de IL-6 a partir de la interpolación de una regresión lineal con un coeficiente de determinación de 0.99 ( $R^2 = 0.99$ ) lo que indica un buen ajuste de los datos a la curva estándar (figura 13 A).

Con la aplicación de Kruskal-Wallis obtuvimos diferencias significativas tanto en el estriado ( $H(3) = 29.494$ ,  $p = 0.001$ ) como en la corteza frontal ( $H(3) = 28.253$ ,  $p = 0.001$ ).

Mediante la prueba de Dunn observamos en ambas estructuras un aumento de las concentraciones de 3-NP comparadas con el grupo control y el grupo tratado con CGA ( $p < 0.05$ ) (figura 13 B y C), de igual manera observamos un aumento de la citocina en el grupo tratado en conjunto con 3-NP+CGA comparándolo con el grupo de CGA, indicando que el 3-NP promueve la producción de IL-6 y podemos intuir que el uso de 3-NP contribuye en los procesos proinflamatorios (Figura 13 B y C).



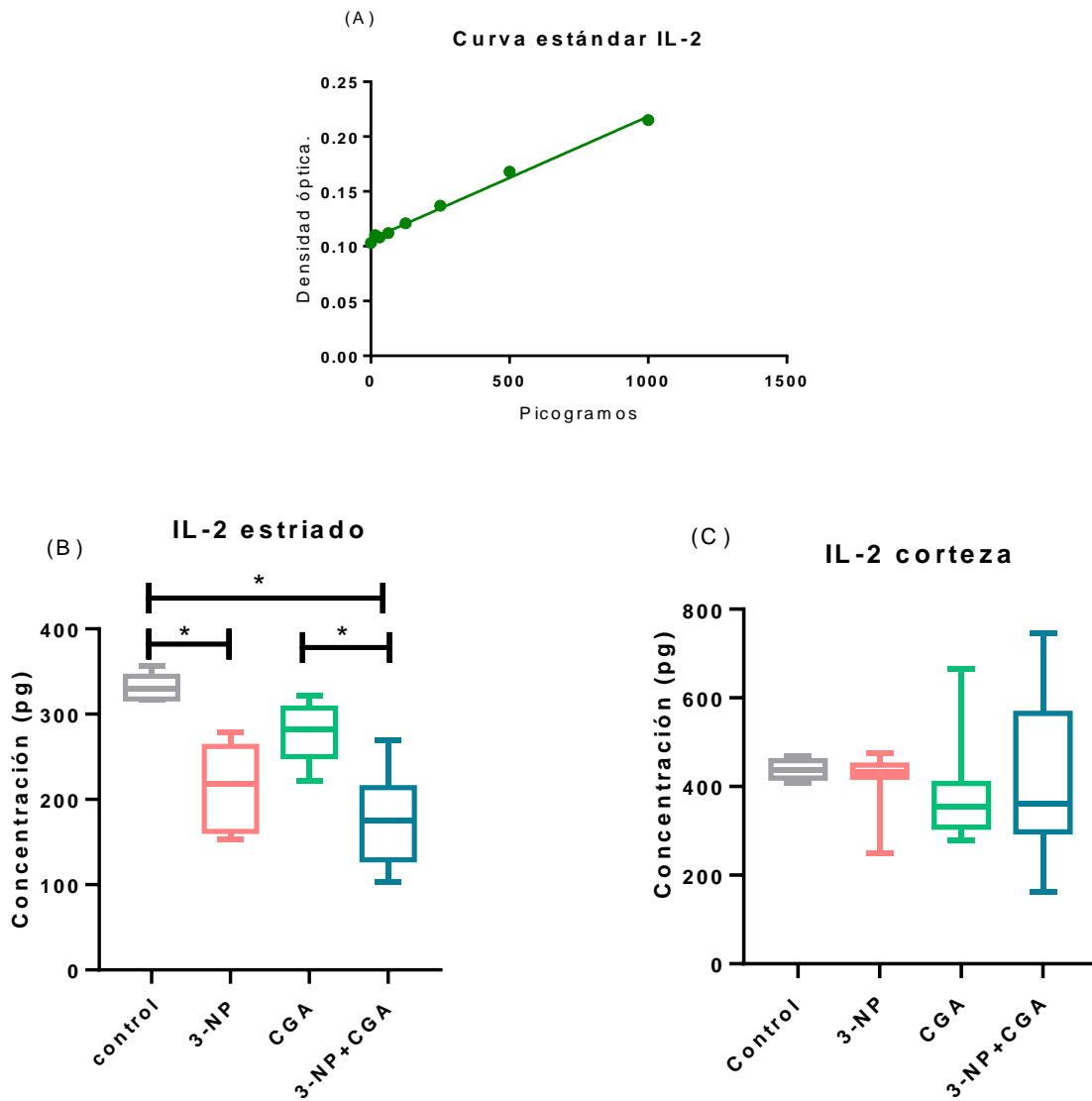
**Figura 13.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de las concentraciones de IL-6. A) concentraciones de la curva estándar. B) Concentraciones en estriado y C) concentraciones en corteza frontal de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), **3-NP** (Ácido 3 nitropropiónico), **CGA** (Ácido clorogénico) y coadministrado con **3-NP** y **CGA**. \* < 0.05, n=8 por grupo.

### 6.5.3. IL-2

En la figura 14 (A) mostramos las densidades ópticas de diferentes concentraciones de la citocina IL-2 recombinante, las cuales fueron utilizadas para obtener una curva estándar; las concentraciones de dicha citocina en muestras de estriado y corteza frontal fueron determinadas mediante análisis de regresión lineal con un coeficiente de determinación de 0.99 ( $R^2=0.99$ ), indicando un buen ajuste de la curva estándar a los datos. El análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis presentó diferencias significativas en estriado ( $H(3) = 19.005$ ,  $p=0.001$ ), donde



posteriormente mediante la prueba de Dunn obtuvimos niveles menores de la citocina en los grupos tratados con 3-NP ( $p < 0.05$ ) y 3-NP + CGA ( $p < 0.05$ ) comparados con el grupo control, además de que el grupo cotratado presento niveles estadísticamente menores de IL-2 comparado con el grupo tratado solo con CGA ( $p < 0.05$ ).



**Figura 14.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de las concentraciones de IL-2. A) concentraciones de la curva estándar. B) Concentraciones en estradiol y C) concentraciones en corteza frontal de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA. \*  $< 0.05$ ,  $n=8$  por grupo.

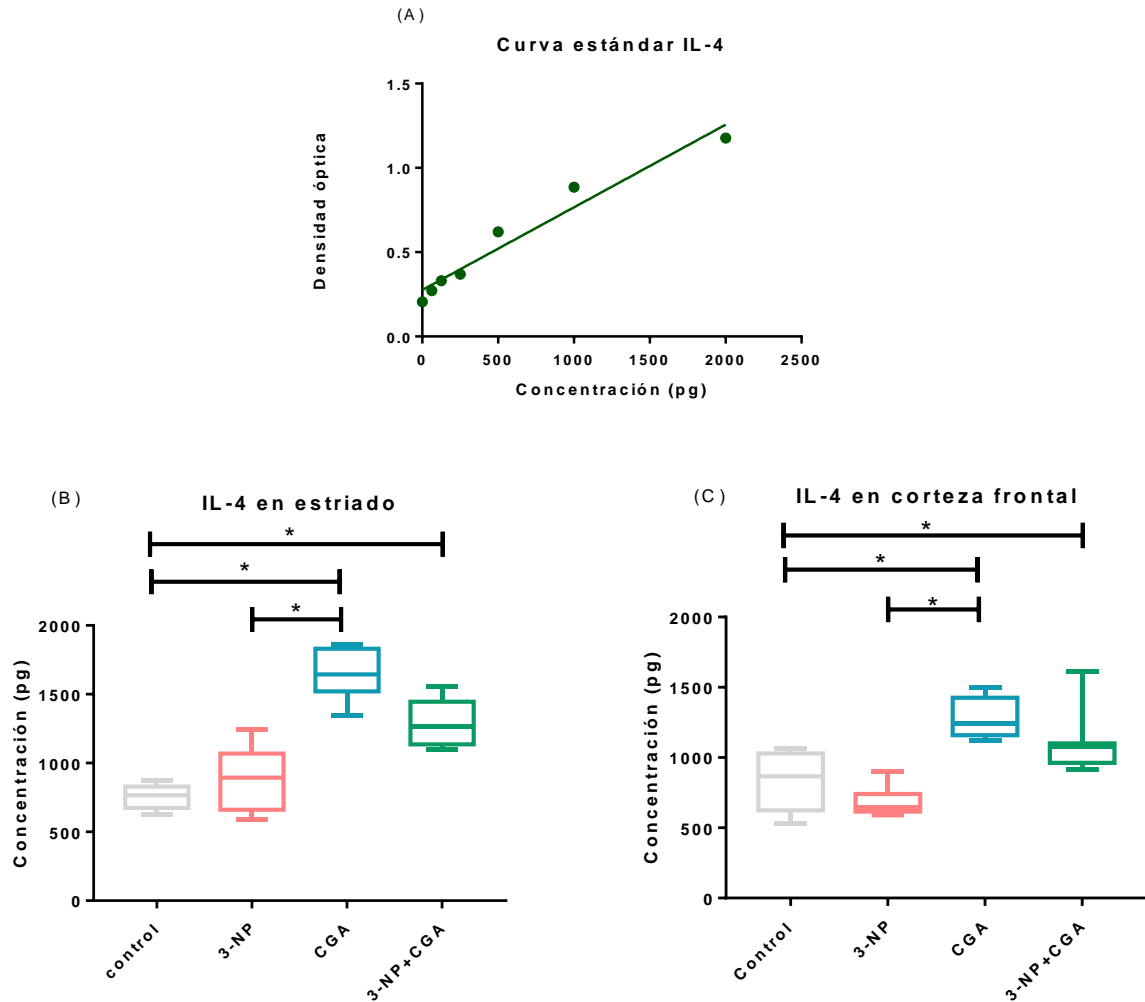


#### 6.5.4. IL-4

Finalmente, del mismo modo obtuvimos las concentraciones de IL-4 a partir de la interpolación de una regresión lineal con un coeficiente de determinación de 0.95 ( $R^2 = 0.95$ ) lo que indica un buen ajuste de los datos a la curva estándar (figura 15 A).

La prueba de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas en las concentraciones de citocinas tanto para el estriado ( $H(3) = 28.143$ ,  $p = 0.001$ ) como para la corteza frontal ( $H(3) = 26.095$ ,  $p = 0.001$ ). Seguido de esto aplicamos la prueba de Dunn la cual mostró que el grupo tratado con CGA presentó mayores niveles de la citocina comparándolos con el grupo control ( $p < 0.05$ ) y con el grupo tratado con 3-NP ( $p < 0.05$ ) en las regiones analizadas, además el grupo tratado en conjunto con 3-NP+CGA también tuvo mayores niveles de IL-4 que el grupo control ( $p < 0.05$ ), lo que nos dice que el tratamiento con CGA promueve la producción de citocinas antiinflamatorias (Figura 15 B y C).





**Figura 15.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de las concentraciones de IL-4. A) concentraciones de la curva estándar. B) Concentraciones en estriado y C) concentraciones en corteza frontal de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), **3-NP** (Ácido 3 nitropropiónico), **CGA** (Ácido clorogénico) y coadministrado con **3-NP y CGA**. \* < 0.05, n=9 por grupo.

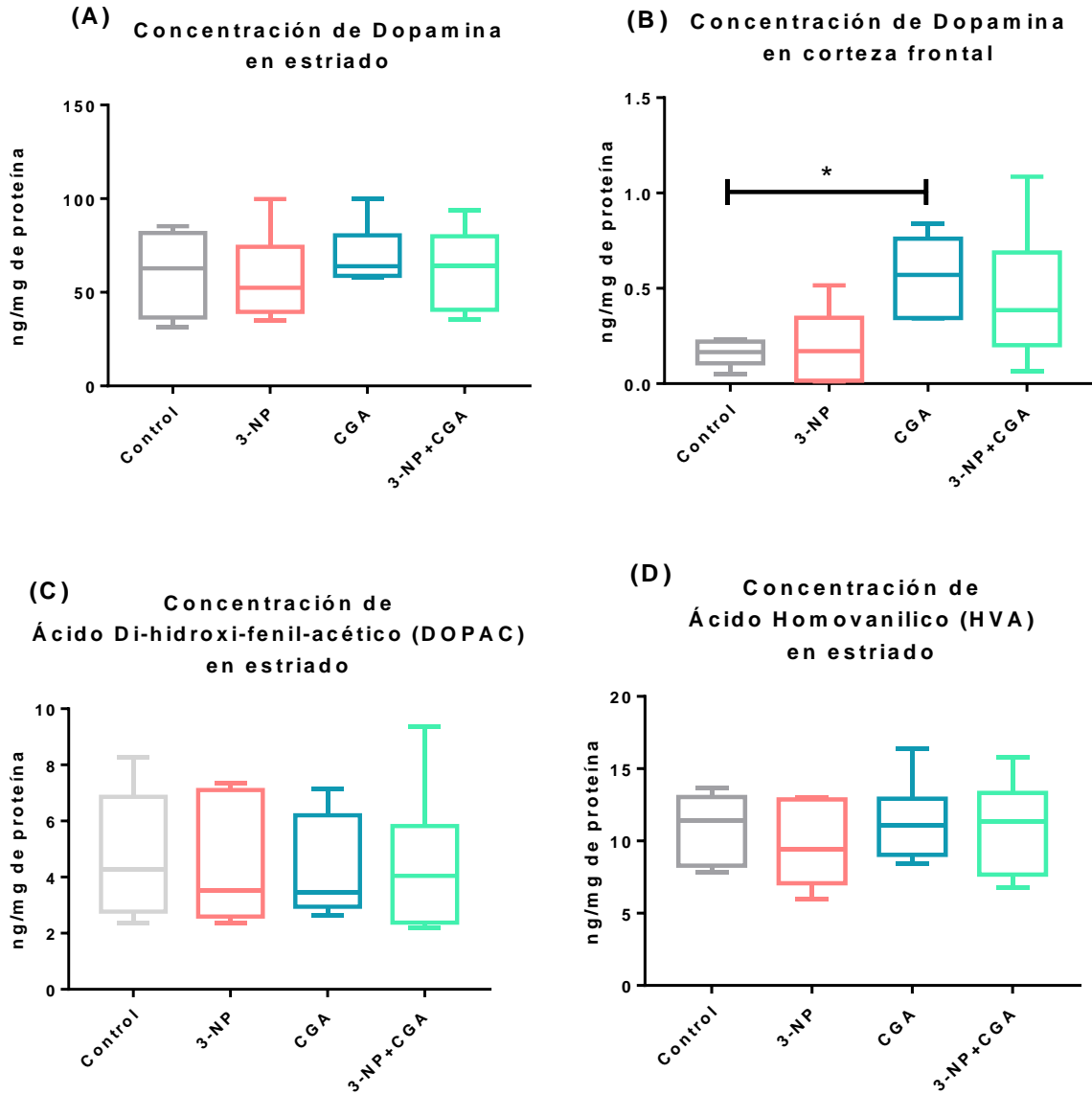


## **6.6. Concentración de neurotransmisores monoaminérgicos**

Una vez mostrado que el modelo con 3-NP promueve la lipoperoxidación e inicia procesos de inflamación en el estriado y la corteza frontal y que el CGA previene el daño ocasionado por un déficit mitocondrial, también nos planteamos investigar la concentración de dopamina y sus metabolitos en el mismo modelo. Debido a que la técnica cromatográfica que utilizamos permite también la detección de los metabolitos de DA y de serotonina (5-HT) así como los metabolitos de 5-HT en el mismo ensayo, decidimos evaluar todos los metabolitos.

### **6.6.1. Concentraciones de dopamina y sus metabolitos**

En la figura 16 podemos observar las concentraciones de dopamina en el estriado y la corteza frontal, así como las concentraciones de los metabolitos de DA en el estriado (no se logró detectar concentraciones de los metabolitos de DA en la corteza). Al aplicar el análisis estadístico de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis obtuvimos diferencias significativas en las concentraciones de DA en la corteza frontal ( $H(3) = 10.599$ ,  $p = 0.014$ ), y al realizar la prueba post hoc de Dunn obtuvimos un aumento significativo entre el grupo tratado con CGA vs el grupo control en corteza frontal ( $p < 0.05$ ) (Figura 16).

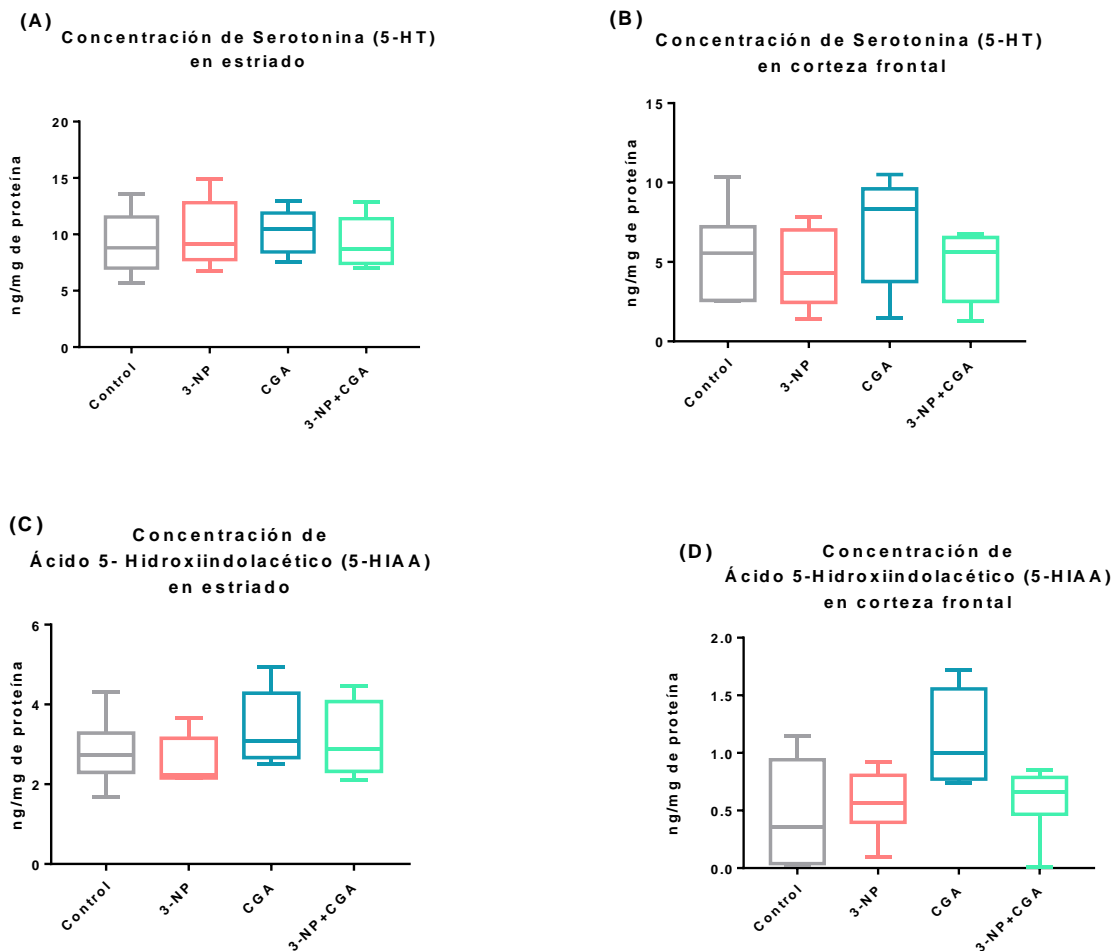


**Figura 16.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de la concentración (ng/mg de proteína) de dopamina en A) estriado y B) corteza frontal, así como concentración de C) ácido di-hidroxi-fenil-acético (DOPAC) y D) ácido homovanílico (HVA) en el estriado de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA. \* < 0.05, n=6 por grupo.



## 6.6.2. Concentraciones de serotonina y su metabolito

En la figura 17 presentamos la cuantificación de 5-HT en estriado y corteza frontal, así como las concentraciones del metabolito de 5-HT en ambas estructuras. Al aplicar el análisis estadístico de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis no obtuvimos diferencias significativas ni en el estriado ni en la corteza frontal tanto para 5-HT como para su metabolito (estriado 5-HT:  $H(3) = 0.967$ ,  $p = 0.809$ ; corteza frontal 5-HT:  $H(3) = 2.073$ ,  $p = 0.557$ ; estriado 5-HIAA:  $H(3) = 3.393$ ,  $p = 0.335$ ; corteza frontal 5-HIAA:  $H(3) = 6.613$ ,  $p = 0.085$ ).



**Figura 17.** Medianas (con rangos intercuartílicos) de la concentración (ng/mg de proteína) de serotonina en estriado (A) y en corteza frontal (B), así como concentración (ng/mg de proteína) de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en estriado (C) y en corteza frontal (D) de ratones C57BL6 tratados con Vehículo (Control, PBS), 3-NP (Ácido 3 nitropropiónico), CGA (Ácido clorogénico) y coadministrado con 3-NP y CGA.  $n=6$  por grupo



## 7.0. Discusión

El ácido 3 nitropropiónico (3-NP) es utilizado como un modelo de neurodegeneración que imita la disfunción mitocondrial producida durante el desarrollo de la enfermedad de Huntington. La severidad en la neurodegeneración provocada por la administración de 3-NP depende de distintos factores, como la especie de roedor que se utilice (rata o ratón), de la cepa del animal con la que se experimente (Wistar, Sprague Dawley, 129SVEMS, C57/BL6, etc.), de la concentración, frecuencia y duración de la administración del 3-NP (Hernández-Echeagaray et al., 2012).

En este trabajo usamos una concentración de 3-NP de 15 mg/kg de peso corporal del roedor durante 5 días, por vía intraperitoneal, lo que asemeja estadios tempranos de neurodegeneración. Los resultados mostraron que todos los ratones obtuvieron una ganancia de peso durante el transcurso de los tratamientos con excepción del grupo coadministrado con 3-NP+CGA quien mantuvo el mismo peso corporal a lo largo del tiempo, lo que implica que la administración en conjunto de 3-NP con CGA produjo un desajuste significativo en el metabolismo de los animales, dicho efecto obtenido en el peso de los sujetos debe estudiarse con mayor profundidad para conocer el mecanismo que altera el metabolismo de los roedores.

Por otra parte el peso de los grupos tratados con 3-NP y 3-NP+CGA fue significativamente menor respecto al grupo tratado con CGA y con el grupo control durante todo el tiempo de tratamiento, sin embargo, algo importante de resaltar es que los sujetos de los grupos control y CGA desde un inicio del tratamiento tuvieron un peso superior a los animales de los grupos 3-NP y 3-NP+CGA, por lo que el cambio del peso corporal encontrado a lo largo de los días no puede ser atribuido a efectos de los tratamientos. lo que concuerda con otros modelos que asemejan estadios tempranos de neurodegeneración utilizando 3-NP (Bak, Kim, Kim, & Choi, 2016), a diferencia de modelos de administración crónica donde si se observa una pérdida de peso corporal de los roedores (Skillings & Morton, 2016)



Otro efecto de la administración sistémica del 3-NP es su unión irreversible al complejo succinato deshidrogenasa mitocondrial. Uno de los principales órganos en los que se ha reportado que el 3-NP induce modificaciones es el hígado (Mirandola et al., 2010; Nishimura et al., 2008). En el presente trabajo observamos un aumento del peso total del hígado de los ratones C57/BL6 tratados con 3-NP, en comparación con los ratones a los que se les administró PBS, confirmando que uno de los órganos afectado por el 3-NP es el hígado. Debido a que el peso del hígado de los grupos tratados mostró diferencias significativas decidimos investigar las enzimas GOT y TGP ya que los niveles de estas enzimas intracelulares son marcadores de la función hepática debido a su participación en la gluconeogénesis del hígado (Felig, 1973). A pesar de que la medición sérica de las transaminasas es ampliamente aceptada para diagnosticar daño hepático crónico, un porcentaje de pacientes con enfermedades hepáticas puede presentar niveles de alanina aminotransferasa normales y tiempo después desarrollar deterioro de hígado grave (H. J. Kim et al., 2020). Por otro lado, se ha demostrado que el CGA se encuentra biodisponible y se metaboliza en todo el tracto gastrointestinal, así como en el hígado y el riñón de humanos. Del total de CGA que ingresa por vía oral, 33% es absorbido a nivel estomacal y el 7% en intestino delgado; el CGA absorbido tanto a nivel estomacal como en el intestino delgado puede ser esterificado convirtiéndose en ácido quínico y ácido cafeico, de esta manera tanto el CGA no esterificado como sus metabolitos son liberados al torrente sanguíneo llegando a hígado y nuevamente es metabolizado (Lu, Tian, Cui, Liu, & Ma, 2020). En el presente estudio la aplicación de CGA en una concentración de 100 mg/kg de peso de los animales no impidió el efecto del 3-NP en la actividad de las transaminasas; la falta de diferencias significativas en la actividad de las transaminasas séricas puede estar ligado al modelo subcrónico de 3-NP que simula etapas tempranas de la neurodegeneración.

Por otro lado, se ha reportado que el principal tejido cerebral afectado con la administración sistémica de 3-NP es el cuerpo estriado, en donde dicho compuesto afecta principalmente a las neuronas espinosas medianas en las que se ha descrito



que a nivel molecular provoca la generación de estrés oxidante, lo que conlleva a la degeneración neuronal (Noha et al., 2020).

En el presente trabajo analizamos el estrés oxidante mediante la producción de lipoperoxidación obteniendo un aumento en el estriado y en la corteza cerebral frontal en el grupo tratado con 3-NP comparado con el grupo control, lo que corrobora que el modelo de administración de 3-NP en ratones C57BL6 provoca estrés oxidante. Por otra parte, la administración de CGA evitó por completo el aumento de los niveles de lipoperoxidación tanto en el grupo tratado solo con CGA como en el grupo tratado con 3-NP + CGA, en el núcleo estriado como la corteza frontal indicando que el de CGA reduce los procesos de estrés oxidante causados por el 3-NP.

Debido a que encontramos diferencias en la lipoperoxidación por la administración de 3-NP, lo que es indicativo de estrés oxidativo en nuestros grupos experimentales, nos dimos a la tarea de evaluar la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el modelo de administración de 3-NP para definir el estado inflamatorio del modelo.

En el SNC se ha reportado que el TNF- $\alpha$  es la principal citocina presente en los procesos inflamatorios (Behzadi & Mubarak, 2020) y que una sobreproducción de TNF- $\alpha$  conlleva a una respuesta inmune proinflamatoria que juega un papel importante en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, aún no se tiene un panorama claro en el que se explique el papel de esta citocina proinflamatoria en el desarrollo de la neurodegeneración (Perry, Dewhurst, Bellizzi, & Gelbard, 2002). Aunque la producción de esta citocina se da en respuesta a una activación inmune, también se ha reportado la presencia del receptor para TNF- $\alpha$  en varios tipos neuronales, así como su actividad neuromoduladora bajo condiciones no inflamatorias (Perry et al., 2002; Vitkovic, Bockaert, & Jacque, 2000). En la presente investigación detectamos la presencia de TNF- $\alpha$  en los diferentes grupos experimentales utilizados tanto en el estriado como en la corteza frontal, observando un aumento significativo de la citocina en el grupo cotratado con 3-NP+CGA comparándolo con el grupo control y comparándolo con el grupo que fue



tratado solamente con CGA en corteza frontal, lo que nos indica que el 3-NP provoca mecanismos inflamatorios en la corteza frontal.

Otra citocina proinflamatoria que comúnmente se encuentra en el sistema nervioso es la interleucina 6 (IL-6), la cual participa en el desarrollo, diferenciación, regeneración y degeneración de las neuronas, así como en la muerte neuronal durante las enfermedades neurodegenerativas (Kummer, Zeidler, Kalpachidou, & Kress, 2021). Nuestros resultados mostraron un aumento significativo de IL-6 en el grupo tratado con 3-NP con respecto al grupo control, como lo han reportado estudios previos (Gendy et al., 2022; Jamwal & Kumar, 2016). Estos resultados sugieren que el CGA reduce el establecimiento de procesos inflamatorios dependientes de IL-6, lo cual puede relacionarse con su efecto antioxidante, similar al efecto reportado para el resveratrol, un polifenol que disminuye citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en otros modelos de neurodegeneración (Li et al., 2017).

La IL-6 es la primera citocina que se incrementa en la EH, debido a que en esta patología hay un aumento en la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), el cual promueve la expresión de IL-6 (Bjorkqvist et al., 2008; Khoshnan et al., 2004; Libermann & Baltimore, 1990), esta activación puede darse por diferentes vías: 1) la proteína huntingtina es capaz de activar este factor de transcripción y favorecer la expresión de IL-6; y 2) mediante la disfunción mitocondrial que se presenta en la EH, se induce la liberación de DNA mitocondrial que provoca la producción de ROS y estas a su vez pueden activar NF- $\kappa$ B y la subsecuente producción de IL-6 (Marchi, Guilbaud, Tait, Yamazaki, & Galluzzi, 2022; Zhao et al., 2021). De igual manera en el modelo con 3-NP se ha reportado que se presenta una disfunción mitocondrial mediante el bloqueo del complejo II mitocondrial produciendo especies reactivas de oxígeno lo que probablemente favorezca el aumento de IL-6 en nuestros resultados. Sin embargo, el CGA puede estar interviniendo mediante su capacidad antioxidante disminuyendo las especies reactivas de oxígeno y con ello evitando la activación de NF- $\kappa$ B y la posterior producción de IL-6.





Por otro lado, se ha reportado que los polifenoles suprimen la degradación de la subunidad  $\text{I}\kappa\text{B}$  de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  impidiendo la translocación de este factor al núcleo y así evitando la transcripción de citocinas proinflamatorias. Además, se ha observado que parte de la actividad antiinflamatoria de los polifenoles consiste en retardar la interacción de las unidades de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  con el DNA, evitando que se expresen genes de proteínas proinflamatorias como quimiocinas y citocinas (Singh, Rai, Birla, Zahra, Rathore, & Singh, 2020). De este modo, la vía antiinflamatoria es una segunda opción por la que el CGA puede estar mediando la disminución de IL-6.

En cuanto a los resultados de IL-2 mostraron una disminución significativa en el grupo tratado con 3-NP y cotratado con 3-NP + CGA comparándolo con el grupo control, además, de que el grupo cotratado también fue significativamente menor al grupo tratado solo con CGA en el cuerpo estriado, lo que nos indica que efectivamente el uso del 3-NP entabla mecanismos inflamatorios en los que se ve involucrado IL-2 en el cuerpo estriado, en contraparte, el grupo de CGA no mostró cambios en la expresión de esta citocina en la corteza frontal y en el estriado, lo cual se ha reportado en modelos de neuro inflamación, donde el uso de CGA no modifica los niveles de IL-2 mientras que promueve un aumento de IL-4 (Lee et al., 2020).

Nuestros resultados de IL-4 mostraron un aumento de esta citocina en el estriado y la corteza cerebral frontal en los grupos de CGA y CGA + 3-NP, pero no en el grupo tratado con 3-NP, esto último debido a que IL-4 es una citocina antiinflamatoria que se expresa durante la inmunidad adaptativa (Ellrichmann, Reick, Saft, & Linker, 2013) y solo se ha reportado su incremento en pacientes con EH avanzada (Bjorkqvist et al., 2008; Ellrichmann et al., 2013; Rocha, Ribeiro, Furr-Stimming, & Teixeira, 2016). Es necesario recordar que el modelo de 3-NP utilizado por nuestro grupo de trabajo promueve degeneración estriatal que imita etapas tempranas de la EH y esta puede ser la razón por la que el grupo tratado con 3-NP no presentó un aumento significativo de IL-4 a diferencia de lo ya reportado.

Finalmente evaluamos los niveles de DA en el modelo de degeneración estriatal promovida por concentraciones subcrónicas de 3-NP. En trabajos previos



se ha demostrado un incremento de DA en cultivos celulares, pero no en un tratamiento *in vivo* sistémico. En nuestra investigación al obtener los niveles de DA y de 5-HT, así como de sus metabolitos en el cuerpo estriado y la corteza frontal, solamente observamos un aumento de dopamina en la corteza cerebral frontal inducido por la administración de CGA.

En estudios previos se ha reportado que el uso de CGA aumenta los niveles de DA y de 5-HT en la corteza de ratones tratados con arsenito de sodio, el cual promueve estrés oxidante a nivel neuronal así como deterioro cognitivo, cambios en el comportamiento y en la coordinación motora (Dina et al., 2020). Además, el CGA protege a las neuronas dopaminérgicas de la apoptosis evitando la disfunción mitocondrial y con ello manteniendo la actividad apropiada de los complejos de la cadena transportadora de electrones mediante el aumento de los niveles de GSH y SOD ya que se sabe que GSH es la principal defensa de las funciones mitocondriales (Singh, Rai, Birla, Zahra, Rathore, Dilnashin, et al., 2020). Por otro lado, se ha reportado que extractos ricos en los flavonoides CGA y ácido cafeico no modifican significativamente los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en estriado de ratas Wistar tratadas con 6-OHDA (Molska et al., 2021).

Es importante señalar que se ha mostrado que la inflamación de otros órganos está relacionada con la neurodegeneración, en particular, la inflamación intestinal crónica donde la microbiota juega un papel importante en el funcionamiento del eje cerebro-intestinal, esto lo hace mediante la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores (GABA y 5-HT, respectivamente) que repercuten en la actividad nerviosa y la regulación del estado de ánimo. A nivel intestinal se ha observado un aumento en los niveles de microbiota, 5-HT, aminoácidos libres y serotonina del colon en puercos alimentados con una dieta rica en CGA (Wu et al., 2018). Dicha serotonina liberada a nivel intestinal puede viajar hasta el sistema nervioso central a través del nervio vago y de la circulación sanguínea y afectar la función cerebral (Zeng, Xiang, Fu, Qu, & Liu, 2022).

En los últimos años el CGA ha recibido atención creciente debido a la diversidad de efectos que tiene en la actividad biológica; se ha visto que tiene



propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antihipertensivas, mejora de los trastornos metabólicos y efectos protectores del tracto intestinal, además de que disminuye la ganancia de peso corporal (Lu et al., 2020), efectos que pueden ser benéficos en las enfermedades neurodegenerativas. En el presente estudio demostramos que el CGA disminuye la peroxidación lipídica en estriado y corteza frontal. Así mismo, obtuvimos que el CGA disminuye la citocina proinflamatoria (IL-6) comparándola con nuestro modelo subcrónico de neurodegeneración 3-NP, lo que concuerda con un aumento de la citocina antiinflamatoria IL-4 en los ratones tratados con CGA en comparación con los sujetos tratados con 3-NP tanto en el estriado como en la corteza frontal. Por otra parte, encontramos que el CGA regula los niveles de DA en la corteza frontal. Por tanto, nuestros resultados muestran que el CGA puede ser utilizado para evitar disfunciones fisiológicas relacionadas con IL-4 en el sistema nervioso ocasionadas por estrés oxidante y procesos inflamatorios.



## 8. CONCLUSIONES

- La administración de 3-NP y CGA no induce cambios en el peso corporal durante el tratamiento.
- La administración de 3-NP produce un incremento en el peso del hígado, mientras que el CGA muestra un comportamiento similar al de los ratones sanos.
- La neurodegeneración temprana causada por la administración de 3-NP produce estrés oxidante tanto en el cuerpo estriado como en la corteza frontal.
- El tratamiento con CGA redujo la lipoperoxidación inducida por el 3-NP tanto en cuerpo estriado como corteza frontal.
- El tratamiento con 3-NP induce la liberación de la citocina proinflamatoria IL-6, mientras que la administración de CGA mantiene niveles similares a los ratones no tratados.
- El 3-NP disminuye los niveles de IL-2 en el estriado.
- El CGA incrementa la liberación de la citocina IL-4, tanto en el estriado como en la corteza frontal.
- La administración de CGA incrementó los niveles de dopamina en corteza frontal.

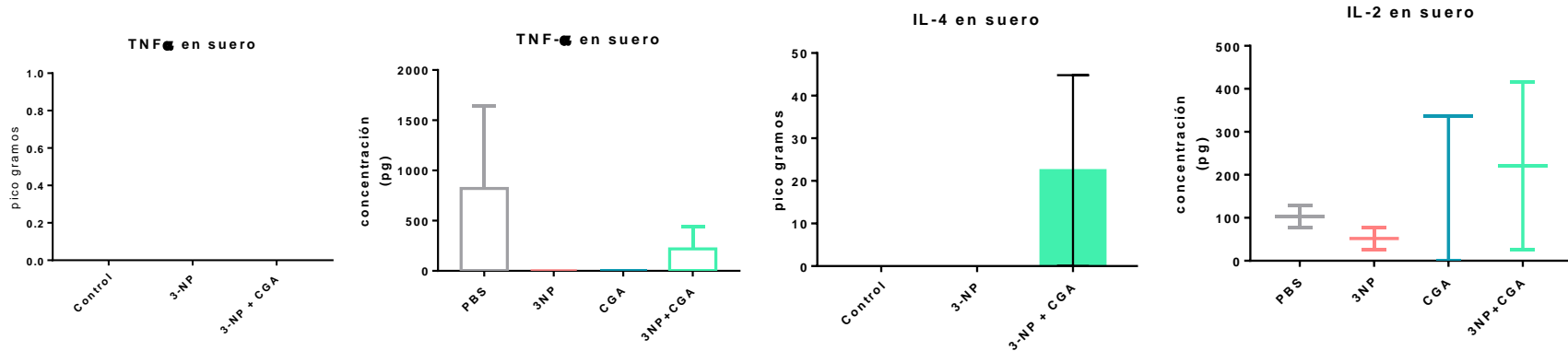


## 9. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente estudio muestran que el CGA tiene efectos benéficos parciales en el estrés oxidativo e inflamación a nivel del cuerpo estriado y de la corteza frontal, sin embargo, es necesario caracterizar mediante técnicas electrofisiológicas si el 3-NP es capaz de modificar el comportamiento sináptico, así como si el CGA puede tener un efecto benéfico en este comportamiento. Por otra parte, tomando en cuenta que el CGA puede ser consumido en diferentes alimentos, es necesario caracterizar si el CGA tiene algún efecto en la microbiota intestinal, ya que esta es una fuente de serotonina que puede llegar a estructuras cerebrales.



## 10. APENDICE 1



Concentraciones en pico gramos para TNF $\alpha$			
Curva estándar	Control	3-NP	3-NP+CGA
0.566	0.202	0.184	0.193
0.502	0.192	0.195	0.191
0.435	0.19	0.201	0.215
0.432	0.181	0.211	0.202
0.428	0.213	0.199	0.22

Concentraciones en pico gramos para IL-6			
Curva estándar	Control	3-NP	3-NP+CGA
0.352	0.168	0.152	0.153
0.331	0.161	0.153	0.161
0.326	0.164	0.163	0.158
0.313	0.164	0.157	0.173
0.312	0.155	0.163	0.167

Concentraciones en pico gramos para IL-4			
Curva estándar	Control	3-NP	3-NP+CGA
0.224	0.163	0.176	0.184
0.215	0.185	0.19	0.189
0.224	0.177	0.182	0.197
0.229	0.18	0.167	0.23
0.211	0.194	0.199	0.19

Concentraciones en pico gramos para IL-2			
Curva estándar	Control	3-NP	3-NP+CGA
0.245	0.214	0.185	0.195
0.235	0.216	0.198	0.192
0.229	0.2	0.196	0.185
0.223	0.203	0.202	0.205
0.209	0.204	0.196	0.185



## 11. Referencias

- Aguilera, P., Chanez-Cardenas, M. E., Floriano-Sanchez, E., Barrera, D., Santamaria, A., Sanchez-Gonzalez, D. J., Perez-Severiano, F., Pedraza-Chaverri, J., & Jimenez, P. D. (2007). Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*, 28(6), 1200-1207. doi:10.1016/j.neuro.2007.07.010
- Alarcon-Herrera, N., Flores-Maya, S., Bellido, B., Garcia-Bores, A. M., Mendoza, E., Avila-Acevedo, G., & Hernandez-Echeagaray, E. (2017). Protective effects of chlorogenic acid in 3-nitropropionic acid induced toxicity and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 109(Pt 2), 1018-1025. doi:10.1016/j.fct.2017.04.048
- Anggreani, E., & Lee, C. Y. (2017). Neuroprotective Effect of Chlorogenic Acids against Alzheimer's Disease. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*, 6(1), 330-337. doi:doi.org/10.19070/2326-3350-1700059
- Arun, R., & Rinshana, F. A. A. (2019). A Review on Natural Antioxidants. *Traditional and Complementary Medicine, IntechOpen*, 1-24. doi:10.5772/intechopen.82636
- Bak, J., Kim, H. J., Kim, S. Y., & Choi, Y. S. (2016). Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in 3-nitropropionic acid-induced striatal neurotoxicity. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 20(3), 279-286. doi:10.4196/kjpp.2016.20.3.279
- Behzadi, P., & Mubarak, M. (2020). Cytokines || Tumor Necrosis Factor Alpha: A Major Cytokine of Brain Neuroinflammation *IntchOpen*, 1-14. doi:10.5772/intechopen.85476
- Bjorkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. V., Benn, C. L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M. W., Brundin, P., Bates, G. P., Leavitt, B. R., Moller, T., & Tabrizi, S. J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1869-1877. doi:10.1084/jem.20080178
- Brendan, J., & Tien, H. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review. *Resources, Conservation & Recycling*, 128, 110-117. doi:doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.001
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M. F., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*, 59(5), 427-468. doi:10.1016/s0301-0082(99)00005-2
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., & Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, 41(5), 646-653. doi:10.1002/ana.410410514



- Bunner, K. D., & Rebec, G. V. (2016). Corticostriatal Dysfunction in Huntington's Disease: The Basics. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10, 317. doi:10.3389/fnhum.2016.00317
- Dina, M. M., Reem, A. A., Manal, F. E.-K., Hany, M. Y., F., Wafa, A. A.-M., Ahmed, M. A. A., Hatem, K. A., & Ahmed, E. A. M. (2020). Chlorogenic acid confers robust neuroprotection against arsenite toxicity in mice by reversing oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Journal of Functional Foods*, 75, 1-9. doi:org/10.1016/j.jff.2020.104202
- Ellrichmann, G., Reick, C., Saft, C., & Linker, R. A. (2013). The role of the immune system in Huntington's disease. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 541259. doi:10.1155/2013/541259
- Felig, P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism*, 22(2), 179-207. doi:10.1016/0026-0495(73)90269-2
- Flores-Hernandez, J., Garzon-Vazquez, J. A., Hernandez-Carballo, G., Nieto-Mendoza, E., Ruiz-Luna, E. A., & Hernandez-Echeagaray, E. (2018). Striatal Neurodegeneration that Mimics Huntington's Disease Modifies GABA-induced Currents. *Brain Sciences*, 8(12). doi:10.3390/brainsci8120217
- Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1350-1358. doi:10.1038/s41593-018-0221-2
- Fu, Y. T., He, F. S., Zhang, S. L., & Zhang, J. S. (1995). Lipid peroxidation in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid. *Toxicol*, 33(3), 327-331. doi:10.1016/0041-0101(94)00173-6
- Gendy, A. M., El-Sadek, H. M., Amin, M. M., Ahmed, K. A., El-Sayed, M. K., El-Haddad, A. E., & Soubh, A. (2022). Glycyrrhizin prevents 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity by downregulating HMGB1/TLR4/NF-kappaB p65 signaling, and attenuating oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Life Sciences*, 314, 121317. doi:10.1016/j.lfs.2022.121317
- Giannini, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*, 172(3), 367-379. doi:10.1503/cmaj.1040752
- Gomez-Pineda, V. G., Torres-Cruz, F. M., Vivar-Cortes, C. I., & Hernandez-Echeagaray, E. (2018). Neurotrophin-3 restores synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of Huntington's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 24(4), 353-363. doi:10.1111/cns.12824
- Grant, D. M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14(4), 421-430. doi:10.1007/BF01797915
- Gubellini, P., Pisani, A., Centonze, D., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2004). Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Progress in Neurobiology*, 74(5), 271-300. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.005
- Hernández-Echeagaray, E., Rosa-López, G., & Mendoza-Duarte, E. (2012). The Use of the Mitochondrial Toxin 3-NP to Uncover Cellular Dysfunction in Huntington's Disease. *INTECH*. doi:10.5772/31284
- Holly, E. N., & Miczek, K. A. (2016). Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(2), 163-186. doi:10.1007/s00213-015-4151-3





- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 288-293. doi:org/10.1016/j.ajme.2017.09.001
- Jamwal, S., & Kumar, P. (2016). Spermidine ameliorates 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced striatal toxicity: Possible role of oxidative stress, neuroinflammation, and neurotransmitters. *Physiology & Behavior Journal*, 155, 180-187. doi:10.1016/j.physbeh.2015.12.015
- Khoshnan, A., Ko, J., Watkin, E. E., Paige, L. A., Reinhart, P. H., & Patterson, P. H. (2004). Activation of the I kappa B kinase complex and nuclear factor-kappa B contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 24(37), 7999-8008. doi:10.1523/JNEUROSCI.2675-04.2004
- Kim, H. J., Kim, S. Y., Shin, S. P., Yang, Y. J., Bang, C. S., Baik, G. H., Kim, D. J., Ham, Y. L., Choi, E. Y., & Suk, K. T. (2020). Immunological measurement of aspartate/alanine aminotransferase in predicting liver fibrosis and inflammation. *Korean Journal of Internal Medicine*, 35(2), 320-330. doi:10.3904/kjim.2018.214
- Kim, J., Lee, S., Shim, J., Kim, H. W., Kim, J., Jang, Y. J., Yang, H., Park, J., Choi, S. H., Yoon, J. H., Lee, K. W., & Lee, H. J. (2012). Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochemistry International Journal*, 60(5), 466-474. doi:10.1016/j.neuint.2012.02.004
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol*, 39(1), 31-59. doi:10.1007/s10571-018-0632-3
- Koch, E. T., & Raymond, L. A. (2019). Dysfunctional striatal dopamine signaling in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 97(12), 1636-1654. doi:10.1002/jnr.24495
- Kummer, K. K., Zeidler, M., Kalpachidou, T., & Kress, M. (2021). Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. *Cytokine*, 144, 155582. doi:10.1016/j.cyto.2021.155582
- Kwon, S. H., Lee, H. K., Kim, J. A., Hong, S. I., Kim, H. C., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K., Kim, Y. B., Lee, S. Y., & Jang, C. G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 210-217. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.001
- Lebouc, M., Richard, Q., Garret, M., & Baufreton, J. (2020). Striatal circuit development and its alterations in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 145, 105076. doi:10.1016/j.nbd.2020.105076
- Lee, T. K., Kang, I. J., Kim, B., Sim, H. J., Kim, D. W., Ahn, J. H., Lee, J. C., Ryoo, S., Shin, M. C., Cho, J. H., Kim, Y. M., Park, J. H., Choi, S. Y., & Won, M. H. (2020). Experimental Pretreatment with Chlorogenic Acid Prevents Transient Ischemia-Induced Cognitive Decline and Neuronal Damage in the Hippocampus through Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects. *Molecules*, 25(16). doi:10.3390/molecules25163578



- Li, D., Liu, N., Zhao, L., Tong, L., Kawano, H., Yan, H. J., & Li, H. P. (2017). Protective effect of resveratrol against nigrostriatal pathway injury in striatum via JNK pathway. *Brain Research*, 1654(Pt A), 1-8. doi:10.1016/j.brainres.2016.10.013
- Libermann, T. A., & Baltimore, D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol*, 10(5), 2327-2334. doi:10.1128/mcb.10.5.2327-2334.1990
- Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., & Bossy-Wetzel, E. (2009). Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death & Differentiation*, 16(6), 899-909. doi:10.1038/cdd.2009.22
- Looi, J. C., & Walterfang, M. (2013). Striatal morphology as a biomarker in neurodegenerative disease. *Molecular Psychiatry*, 18(4), 417-424. doi:10.1038/mp.2012.54
- Lopez-Armada, M. J., Riveiro-Naveira, R. R., Vaamonde-Garcia, C., & Valcarcel-Ares, M. N. (2013). Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion*, 13(2), 106-118. doi:10.1016/j.mito.2013.01.003
- Lu, H., Tian, Z., Cui, Y., Liu, Z., & Ma, X. (2020). Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3130-3158. doi:10.1111/1541-4337.12620
- Marchi, S., Guilbaud, E., Tait, S. W. G., Yamazaki, T., & Galluzzi, L. (2022). Mitochondrial control of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 1-15. doi:10.1038/s41577-022-00760-x
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 34. doi:10.1186/1478-811X-11-34
- Mendoza, E., Miranda-Barrientos, J. A., Vazquez-Roque, R. A., Morales-Herrera, E., Ruelas, A., De la Rosa, G., Flores, G., & Hernandez-Echeagaray, E. (2014). In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience*, 280, 156-170. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.018
- Mirandola, S. R., Melo, D. R., Saito, A., & Castilho, R. F. (2010). 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *Journal of Neuroscience Research*, 88(3), 630-639. doi:10.1002/jnr.22239
- Molska, G. R., Paula-Freire, L. I. G., Sakalem, M. E., Kohn, D. O., Negri, G., Carlini, E. A., & Mendes, F. R. (2021). Green coffee extract attenuates Parkinson's-related behaviors in animal models. *journal of Academia Brasileira de Ciências*, 93(suppl 4), e20210481. doi:10.1590/0001-3765202120210481
- Morán, M. I. (2013). PARTICIPACIÓN DE LAS NEUROTROFINAS BDNF Y NT-4/5 EN LA MODULACIÓN DE LA COMUNICACIÓN SINÁPTICA CORTICO-ESTRIATAL. (Biólogo), Universidad Nacional Autónoma de México Estado de México.
- Napolitano, M., Centonze, D., Gubellini, P., Rossi, S., Spiezia, S., Bernardi, G., Gulino, A., & Calabresi, P. (2004). Inhibition of mitochondrial complex II alters striatal expression of genes involved in glutamatergic and dopaminergic



- signaling: possible implications for Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 15(2), 407-414. doi:10.1016/j.nbd.2003.11.021
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 67-74. doi:10.1016/j.biopha.2017.10.064
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614-1641. doi:10.1021/cr078224o
- Nishimura, M., Okimura, Y., Fujita, H., Yano, H., Lee, J., Suzaki, E., Inoue, M., Utsumi, K., & Sasaki, J. (2008). Mechanism of 3-nitropropionic acid-induced membrane permeability transition of isolated mitochondria and its suppression by L-carnitine. *Cell Biochemistry & Function*, 26(8), 881-891. doi:10.1002/cbf.1521
- Noha, H. S., Nevine, F., Mona, A. K., Mostafa, A. R., Ahmed, F. M., & Ahmed, S. K. (2020). Vildagliptin Attenuates Huntington's Disease through Activation of GLP-1 Receptor/PI3K/Akt/BDNF Pathway in 3-Nitropropionic Acid Rat Model. *Neurotherapeutics*, 17, 252-268. doi:org/10.1007/s13311-019-00805-5
- Perry, S. W., Dewhurst, S., Bellizzi, M. J., & Gelbard, H. A. (2002). Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *5Journal of NeuroVirology*, 8(6), 611-624. doi:10.1080/13550280290101021
- Polidori, M. C., Mecocci, P., Browne, S. E., Senin, U., & Beal, M. F. (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neuroscience Letters*, 272(1), 53-56. doi:10.1016/s0304-3940(99)00578-9
- Purves, D., Augustine, J. G., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience* (D. Purves Ed. Third Edition ed.). Sunderland, Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates, Inc.
- Rocha, N. P., Ribeiro, F. M., Furr-Stimming, E., & Teixeira, A. L. (2016). Neuroimmunology of Huntington's Disease: Revisiting Evidence from Human Studies. *Mediators of Inflammation*, 2016, 8653132. doi:10.1155/2016/8653132
- Rodriguez, E., Rivera, I., Astorga, S., Mendoza, E., Garcia, F., & Hernandez-Echeagaray, E. (2010). Uncoupling oxidative/energy metabolism with low sub chronic doses of 3-nitropropionic acid or iodoacetate in vivo produces striatal cell damage. *International Journal of Biological Sciences*, 6(3), 199-212. doi:10.7150/ijbs.6.199
- Rosenstock, T. R., Duarte, A. I., & Rego, A. C. (2010). Mitochondrial-associated metabolic changes and neurodegeneration in Huntington's disease - from clinical features to the bench. *Current Drug Targets*, 11(10), 1218-1236. doi:10.2174/1389450111007011218
- Singh, S. S., Rai, S. N., Birla, H., Zahra, W., Rathore, A. S., Dilnashin, H., Singh, R., & Singh, S. P. (2020). Neuroprotective Effect of Chlorogenic Acid on Mitochondrial Dysfunction-Mediated Apoptotic Death of DA Neurons in a Parkinsonian Mouse Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 6571484. doi:10.1155/2020/6571484



- Singh, S. S., Rai, S. N., Birla, H., Zahra, W., Rathore, A. S., & Singh, S. P. (2020). NF-kappaB-Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Potential Therapeutic Effect of Polyphenols. *Neurotoxicity Research*, 37(3), 491-507. doi:10.1007/s12640-019-00147-2
- Skillings, E. A., & Morton, A. J. (2016). Delayed Onset and Reduced Cognitive Deficits through Pre-Conditioning with 3-Nitropropionic Acid is Dependent on Sex and CAG Repeat Length in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease*, 5(1), 19-32. doi:10.3233/JHD-160189
- Tabrizi, S. J., Workman, J., Hart, P. E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (2000). Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Annals of Neurology*, 47(1), 80-86. doi:10.1002/1531-8249(200001)47:1<80::aid-ana13>3.3.co;2-b
- Tai, Y. F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S. J., Barker, R. A., Brooks, D. J., & Piccini, P. (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*, 130(Pt 7), 1759-1766. doi:10.1093/brain/awm044
- Valadao, P. A. C., Santos, K. B. S., Ferreira, E. V. T. H., Macedo, E. C. T., Teixeira, A. L., Guatimosim, C., & de Miranda, A. S. (2020). Inflammation in Huntington's disease: A few new twists on an old tale. *Journal of Neuroimmunology*, 348, 577380. doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577380
- van Horssen, J., van Schaik, P., & Witte, M. (2019). Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? *Neuroscience Letters*, 710, 132931. doi:10.1016/j.neulet.2017.06.050
- Vitkovic, L., Bockaert, J., & Jacque, C. (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 457-471. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.740457.x
- Walker, J., Rohm, B., Lang, R., Pariza, M. W., Hofmann, T., & Somoza, V. (2012). Identification of coffee components that stimulate dopamine release from pheochromocytoma cells (PC-12). *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 390-398. doi:10.1016/j.fct.2011.09.041
- Wang, L. H., & Qin, Z. H. (2006). Animal models of Huntington's disease: implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(10), 1287-1302. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00410.x
- Witte, M. E., Geurts, J. J., de Vries, H. E., van der Valk, P., & van Horssen, J. (2010). Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion*, 10(5), 411-418. doi:10.1016/j.mito.2010.05.014
- Wu, Y., Liu, W., Li, Q., Li, Y., Yan, Y., Huang, F., Wu, X., Zhou, Q., Shu, X., & Ruan, Z. (2018). Dietary chlorogenic acid regulates gut microbiota, serum-free amino acids and colonic serotonin levels in growing pigs. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 69(5), 566-573. doi:10.1080/09637486.2017.1394449
- Zang, L. Y., Cosma, G., Gardner, H., Castranova, V., & Vallyathan, V. (2003). Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 247(1-2), 205-210. doi:10.1023/a:1024103428348



- Zeng, L., Xiang, R., Fu, C., Qu, Z., & Liu, C. (2022). The Regulatory effect of chlorogenic acid on gut-brain function and its mechanism: A systematic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *149*, 112831. doi:10.1016/j.biopha.2022.112831
- Zhao, Y., Liu, B., Xu, L., Yu, S., Fu, J., Wang, J., Yan, X., & Su, J. (2021). ROS-Induced mtDNA Release: The Emerging Messenger for Communication between Neurons and Innate Immune Cells during Neurodegenerative Disorder Progression. *Antioxidants (Basel)*, *10*(12). doi:10.3390/antiox10121917